

**SYNTHÈSE DE LA TOMATIDINE, UN STÉROÏDE ALCALOÏDE CIBLANT LES
SOUCHES PERSISTANTES DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

par

Chad Normandin

Mémoire présenté au Département de chimie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, Avril 2020

Le 7 avril 2020

*Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Chad Normandin
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Éric Marsault
Directeur de recherche
Département de pharmacologie-physiologie

Professeur Claude Spino
Évaluateur interne
Département de chimie

Professeur Guillaume Bélanger
Président-rapporteur
Département de chimie

Ces travaux sont dédiés à la mémoire d'Alexandre Poirier.

"It is not the critic who counts; not the man who points out how the strong man stumbles, or where the doer of deeds could have done them better. The credit belongs to the man who is actually in the arena, whose face is marred by dust and sweat and blood; who strives valiantly; who errs, who comes short again and again, because there is no effort without error and shortcoming; but who does actually strive to do the deeds; who knows great enthusiasms, the great devotions; who spends himself in a worthy cause; who at the best knows in the end the triumph of high achievement, and who at the worst, if he fails, at least fails while daring greatly, so that his place shall never be with those cold and timid souls who neither know victory nor defeat."

- Theodore Roosevelt

SOMMAIRE

Staphylococcus aureus est une bactérie capable d'adopter de multiples mécanismes pour résister aux antibiotiques. Un de ces mécanismes de résistance est un changement de son phénotype, passant du phénotype sauvage à un phénotype de variants à petites colonies (*Small Colony Variants*, SCV), qui abaisse sa susceptibilité aux antibiotiques. Les professeurs François Malouin et Kamal Bouarab ont démontré le potentiel antibiotique d'un produit naturel contre les SCV de *Staphylococcus Aureus* : la tomatidine. La tomatidine, un alcaloïde stéroïdien complexe, est présent dans la nature en faibles concentrations. Afin de pouvoir valoriser ce produit, il a donc été impératif de trouver une voie synthétique pour accéder à cette molécule, connue maintenant depuis plus de 70 années. Les travaux présentés dans ce mémoire témoigneront des efforts qui ont été effectués afin d'arriver à la première synthèse diastéréosélective de ce produit naturel.

Initialement, les efforts ont été centrés sur la synthèse de la tomatidine directement à partir d'un phytostéroïde commercial, la yamogénine. Plusieurs méthodologies ont été utilisées pour fonctionnaliser ce stéroïde et en faire l'alcaloïde voulu directement. Après plusieurs mois d'essais, il a été réalisé que ce substrat commercial possédait un centre asymétrique inversé par rapport à ce qui a été affiché par le commerçant, une stéréochimie nécessaire au produit naturel. Ceci nous a donc forcé à revenir à la case départ et à modifier la stratégie de synthèse.

Nous avons ensuite essayé d'arriver à l'alcaloïde désiré en passant par l'alkylation par synthon asymétrique d'une lactone stéroïdienne pentacyclique obtenue rapidement à partir de la diosgénine. Cette dernière possédait la majorité du fragment stéroïdien nécessaire et une fonction ester cyclique (lactone) parfaite pour jouer le rôle d'électrophile. La stratégie d'addition d'un synthon asymétrique par alkylation sur cette lactone a donc été intuitive.

Le synthon fonctionnalisé à cinq carbones nécessaire a été généré par synthèse asymétrique. Après que ce fragment ait été inséré, des optimisations ont été requises. Les essais de fonctionnalisation de l'adduit ont mené à une cyclisation non désirée qui a généré le spirocétal correspondant au lieu d'obtenir l'alcool linéaire désiré. Des efforts ont été consacrés à contourner ce problème en augmentant le niveau d'oxydation et changeant la nature de l'hétéroatome du synthon alkylant, mais en vain.

En ayant ce spirocétal en main, cette fois-ci avec la bonne stéréochimie, l'expérience acquise pendant les huit premiers mois dans la fonctionnalisation de cette fonction a été mise à profit. L'ouverture, la substitution par azote et la fermeture du cycle F de manière diastéréosélective ont permis d'instaurer la fonction spiroaminocétale du produit naturel en seulement deux étapes. Cette méthodologie a permis la génération du produit naturel, au total en 11 étapes (séquence linéaire la plus longue) et avec un rendement global de 24.9%. Ce travail a mené à la première synthèse de la tomatidine, qui a pu être appliquée à une échelle multi grammes.

Mots clés : Tomatidine, Alcaloïde, Produit naturel, Synthèse, Spiroaminocétal, *Staphylococcus aureus*, Antibiotique.

REMERCIEMENTS

Je remercie beaucoup le Professeur Éric Marsault de m'avoir confié un projet d'une telle envergure. Suite à un stage effectué en 2016, j'ai su qu'il était un bon leader et que ce laboratoire allait être un excellent environnement pour mes études graduées. Il a su bien m'éclairer tout au long de mon projet et a supporté mes idées souvent excentriques qui, à la fin, ont toutefois fini par payer.

Un chaleureux merci au P^r Claude Spino et au P^r Guillaume Bélanger qui ont accepté de réviser ce mémoire et qui ont aussi été d'excellents formateurs et de grandes inspirations tout au long de ma formation universitaire. Merci à René Gagnon pour son support avec les instruments analytiques, à Philippe Venne pour les analyses par spectrométrie de masse, à Luc Tremblay pour son support continu avec la RMN. Merci également au P^r Claude Legault pour son aide en chimie computationnelle et à Daniel Fortin pour l'analyse par diffraction des rayons X de mes échantillons.

J'aimerais dire un merci bien spécial à Pierre-Luc Boudreault, mon superviseur de stage T2 en 2016, pour son support et sur qui j'ai pu compter de nombreuses fois, autant pour des discussions intellectuelles que questionnables. Merci à tous les membres et stagiaires du laboratoire Marsault pour avoir rendu ces deux années agréables en y amenant une atmosphère conviviale et chaleureuse, autant par les discussions et débats sur la chimie qu'en amenant votre bonne humeur. Shoutout spécial à Michael '*Rich Homie Mike*' Desgagnés pour avoir été mon allié droit pendant ces deux années, pour avoir su continuellement alimenter des discussions enflammées et pour avoir toujours été d'une bonne oreille. Merci à Kien Trân pour son aide, sa bonne humeur et sa présence pendant nos multiples longues soirées / nuits passées ensemble au laboratoire!

Merci au regroupement *PROTEO* (regroupement stratégique de *Fonds de Recherche Québécois sur la Nature et les Technologies*) et *Fibrose Cystique Canada* pour le financement de ce projet de recherche.

Finalement, un énorme merci à la personne la plus importante à mes yeux. Merci de m'avoir soutenu et d'avoir cru en moi dans mes très hauts comme dans mes très bas, de m'avoir inculqué des valeurs comme la persévérance, la discipline, le dur travail et l'intégrité dès mon jeune âge. Même si la chimie c'est du chinois pour toi, je n'aurais pas pu entamer un projet d'une telle envergure ni moins avoir la persévérance requise pour réussir sans avoir ces outils dans mon coffre à outils. Je t'aime Maman.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
REMERCIEMENTS	V
TABLE DES MATIERES	VI
LISTE DES ABREVIATIONS	VIII
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES FIGURES	XI
LISTE DES SCHEMAS.....	XII
INTRODUCTION.....	1
I.1. Les bactéries	1
I.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	2
I.2. Les antibiotiques.....	3
I.2.1. Les antibiotiques synthétiques	4
I.2.2. Les antibiotiques issus de produits naturels	6
I.2.2.1. Les β -lactames	6
I.2.2.2. Les aminoglycosides	7
I.1.2. Les mécanismes de résistance chez les bactéries'	9
I.1.2.1. Modifications de l'antibiotique	9
I.1.2.2. Diminution de la pénétration intracellulaire.....	10
I.1.2.3. Altérations de la cible.....	10
I.1.3. La résistance chez <i>Staphylococcus aureus</i>	11
I.1.3.1. Les souches résistantes de <i>Staphylococcus aureus</i>	12
I.1.3.2. Les variants à petite colonies et le biofilm	13
I.3. La tomatidine	16
I.3.1. Biosynthèse et sources naturelles.....	16
I.3.2. Activité biologique de la tomatine et la tomatidine	17
I.3.3. Synthèses précédentes de produits naturels possédant la fonction spiroaminocétale ..	19
I.3.3.1. Pandamarilactone 1	19
I.3.3.2. Azaspiracide-1	20
I.3.3.3. Marineosine A.....	23
I.3.3.4. Solasodine.....	25
I.3.3.5. Hydantocidine.....	27
I.4. Analyses rétrosynthétiques et objectifs de cette synthèse.	29

CHAPITRE 1. EFFORTS VERS LA SYNTHÈSE DE LA TOMATIDINE	33
1.1. Analyse rétrosynthétique 1 : Piégeage de la cétone du spirocétal de la yamogénine	33
1.2. Analyse rétrosynthétique 2 : ouverture et fonctionnalisation de l'anneau F de la yamogénine	35
1.3. Analyse rétrosynthétique 3 : Alkylation et fonctionnalisation d'une lactone dinorcholanique	40
1.3.1. Génération du synthon asymétrique	41
1.3.2. Alkylation de la lactone dinorcholanique	43
1.3.2.1. Addition organométallique via réactif de Grignard	43
1.3.2.2. Addition organométallique via alkyllithien (alcool)	44
1.3.2.3. Addition organométallique via alkyllithien (aldéhyde)	50
CHAPITRE 2. SYNTHÈSE SUR GRANDE ÉCHELLE DE LA TOMATIDINE	55
2.1. Rôle des auteurs	55
2.2. Gram-scale Synthesis of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Antibiotic Properties Against Persistent Forms of <i>Staphylococcus aureus</i>	56
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	82
REFERENCES ET NOTES	84
ANNEXE 1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DES TRAVAUX PRÉSENTES	96
ANNEXE 2 : SPECTRES DE RÉSONNANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DES TRAVAUX PRÉSENTES	106
ANNEXE 3 : SPECTRES DE RÉSONNANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ	115
ANNEXE 4 : PARAMÈTRES ET COORDONNÉES DES STRUCTURES ANALYSÉES PAR DIFFRACTION DES RAYONS-X DES TRAVAUX PRÉSENTES	125
ANNEXE 5 : PARAMÈTRES ET COORDONNÉES DES STRUCTURES ANALYSÉES PAR DIFFRACTION DES RAYONS-X DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ	127

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAP	Accumulation-associated protein
ACC	Acétyltransférase
ACN	Acétonitrile
ADN	Acide désoxyribonucléotique
AL	Acide de Lewis
AME	Aminoglycoside-Modifying Enzyme
AMG	Aminoglycoside
ANT	Adényltransférase
APH	Phosphotransférase
AZA	Azaspiracide
9-BBN	9-borabicyclo[3.3.1]nonane
Bn	Benzyl
Boc ₂ O	Pyrocarbonate de di- <i>t</i> -butyle
CCM	Chromatographie sur couche mince
CSA	Acide (+)-camphorsulfonique
COSY	Spectroscopie de corrélation
DCM	Dichlorométhane
DEAD	Azadicarboxylate de diéthyle
3,4-DHP	3,4-Dihydro-2 <i>H</i> -pyrane
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone
DMF	<i>N,N</i> -diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FC	Fibrose Cystique
GAME	GLYCOALCALOID METABOLISM
GTP	Guanidine Triphosphate
GP	Groupe protecteur
HGT	Horizontal Gene Transfer
HLF	Hofmann-Löffler-Freytag
HMBC	Spectroscopie de corrélation hétéronucléaire à lien multiples

HMG-CoA	Hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A
HMPA	Hexaméthylphosphoramide
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HQNO	2- <i>n</i> -heptyl-4-hydroxyquinolone
LAH	Tétrahydruroaluminate de lithium
LiHMDS	Bis(triméthylsilyl)amidure de lithium
Ns	2-nitrophenylsulfonyl
<i>P. chrysogenum</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBP2a	Penicillin-binding protein 2a
PD	Produit de départ
PMB	4-Méthoxybenzyle
PPTS	<i>para</i> -toluènesulfonate de pyridinium
<i>p</i> TsOH	Acide <i>para</i> -toluènesulfonique
d.r.	Ratio diastéréomérique
RMN	Résonance magnétique nucléaire
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline
SARP	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la pénicilline
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine
SCV	Variants à petite colonie (<i>Small Colony Variants</i>)
TA	Température ambiante
TBDPS	<i>tert</i> -butyl-di-phénylsilyle
THF	Tétrahydrofurane
THP	Tétrahydropyranyle
TMSCl	Chlorure de triméthylsilyle
TMSI	Iodure de triméthylsilyle
TO	Tomatidine

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Conditions testées du piégeage du cétodiol 56	34
Tableau 2. Essais d'optimisation de la réduction de l'azoture 61	37
Tableau 3. Tentative d'isomérisation des spiroaminocétals isolés	39
Tableau 4. Essais d'alkylation de 72 par des réactifs de Grignard	44
Tableau 5. Optimisation de l'alkylation de 72 par des réactifs d'alkyllithium.....	46
Tableau 6. Tentatives de déprotection de l'éther 81	48
Tableau 7. Tentatives de cyclisation en cascade de 99	53
Tableau 8. Crystal data and structure refinement for 48-1	125
Tableau 9. Crystal data and structure refinement for 63	126

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Deux types de paroi cellulaire bactérienne	2
Figure 2. Isomères de l'arsphénamine (Salvarsan)	4
Figure 3. Molécules antibiotiques inorganiques développées par Sterenberg <i>et al.</i>	5
Figure 4. Affiches portraying les bienfaits de la pénicilline entre 1939 et 1945.....	6
Figure 5. Structure de la gentamicine.....	9
Figure 6. β -lactames et inhibiteurs de β -lactamases.....	10
Figure 7. Statistiques de recherche sur <i>S. aureus</i>	12
Figure 8. Comparaison entre la pénicilline et la méthicilline.....	13
Figure 9. Structure de la vancomycine	14
Figure 10. Relation entre les souches <i>Wild-type</i> et SCV de <i>S. aureus</i>	15
Figure 11. Facteurs favorisant le phénotype SCV lors de la cohabitation avec <i>P. aeruginosa</i>	15
Figure 12. Structures de la tomatine et la tomatidine.....	16
Figure 13. Structure de la bédaquiline.....	18
Figure 14. Structures 2D et 3D de la Pandamarilactone-1	19
Figure 15. Structure 2D de l'(-)-azaspiracide-1 9 et sa fonction spiroaminocétale en 3D.....	21
Figure 16. Structures 2D et 3D de la marineosine A.....	23
Figure 17. Structures de la solasodine et solamargine	25
Figure 18. Structure de l'hydantocidine 36 et spirohydantoïne 37	28
Figure 19. Diagrammes ORTEP de la tomatidine 1 et de la dihydrosolasodine 63	36
Figure 20. Énergies libres théoriques relatives de la tomatidine 1 et de la dihydrosolasodine 63	38
Figure 21. Synthèse et diagramme ORTEP de l'intermédiaire cristallisé 48-1	40
Figure 22. Structure des auxiliaires chiraux utilisés dans la préparation de 54	41
Figure 23. Corrélations COSY et HMBC sélectionnées pour 98	52

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1	5
Schéma 2	7
Schéma 3	8
Schéma 4	16
Schéma 5	17
Schéma 6	20
Schéma 7	22
Schéma 8	23
Schéma 9	24
Schéma 10	25
Schéma 11	26
Schéma 12	27
Schéma 13	28
Schéma 14	29
Schéma 15	30
Schéma 16	31
Schéma 17	32
Schéma 18	33
Schéma 19	35
Schéma 20	35
Schéma 21	36
Schéma 22	38
Schéma 23	41
Schéma 24	42
Schéma 25	43
Schéma 26	44
Schéma 27	45
Schéma 28	45
Schéma 29	45
Schéma 30	47

Schéma 31..... 48

Schéma 32..... 49

Schéma 33..... 51

Schéma 34..... 52

Schéma 35..... 53

Schéma 36..... 54

Schéma 37..... 83

INTRODUCTION

I.1. Les bactéries

Depuis le début de l'humanité, l'humain essaie de comprendre et d'étudier son entourage, son existence et tous les phénomènes s'y rapportant. Durant le dernier siècle, l'avancement exponentiel de la science et des technologies ont permis grandement d'augmenter l'espérance de vie de l'homme, passant de 28 années à la fin du 18^e siècle, 45 ans à la fin du 19^e siècle, à 78 ans pour la fin du 20^e siècle.¹ Les progrès en médecine et en hygiène y sont pour beaucoup. C'est dès le Moyen Age que la théorie du 'miasma' (mot originant du grec μῑασμα, signifiant la 'pollution', 'air nauséabond', 'vapeurs contaminées') fut utilisée afin de décrire l'origine de plusieurs maladies. En 1546, le professeur italien Girolamo Fracastoro a proposé une théorie sur des particules transmissibles, invisibles à l'œil nu jouant le rôle de 'semences' qui seraient la cause de plusieurs maladies.² Plusieurs siècles plus tard, en 1860, le médecin français Casimir Davaine démontra que des transfusions de sang de personnes étant atteint de l'anthrax vers des patients sains provoquaient l'infection, prouvant que le sang était un média convenable capable de transmettre la maladie. C'est aussi vers la fin du 19^e siècle que Louis Pasteur contribua à notre compréhension des infections d'aujourd'hui, et que le médecin allemand Robert Koch proposa ses '4 postulats de Koch', établissant un lien causal entre les microbes et les maladies lors de ses études sur la tuberculose.³ Les postulats de Koch sont : la bactérie doit être présente dans chaque cas de la maladie; la bactérie doit être isolée de l'hôte infecté et cultivée dans un milieu de culture; la maladie spécifique à l'infection doit être reproduite lorsqu'une culture pure de la bactérie est inoculée dans un hôte sain; les bactéries doivent être récupérables chez l'hôte infecté.³

Pendant cette même période, le bactériologiste danois Hans Christian Gram travaillait sur le développement de méthodes permettant la visualisation des bactéries, des microorganismes unicellulaires procaryotes (organisme dont le noyau cellulaire est mêlé au cytoplasme) dans des tissus de poumons.⁴ Observant que certains types de bactéries ne répondaient pas au traitement contrairement à d'autres, ses travaux se sont conclus sur la définition de deux grandes classifications de bactéries, soit Gram-positives ou Gram-négatives. Ce test est basé sur la coloration des bactéries suite au traitement d'une teinture histologique : le chlorure d'hexaméthylpararosaniline, plus connu sous le nom de 'cristal violet'. Le test colorimétrique indique une bactérie dite Gram-négative quand les bactéries sont colorées rose suite au test. Cette coloration indique que la paroi cellulaire de ces bactéries possède une membrane extérieure dotée de lipopolysaccharides (vert, **Figure 1**) et une membrane interne

cytoplasmique, séparée par une fine couche de peptidoglycans. Une coloration mauve suite à ce test indique que les bactéries sont à Gram-positif, et que la paroi cellulaire extérieure contient plusieurs couches de peptidoglycans libres de lipopolysaccharides ainsi qu'une couche interne cytoplasmique.

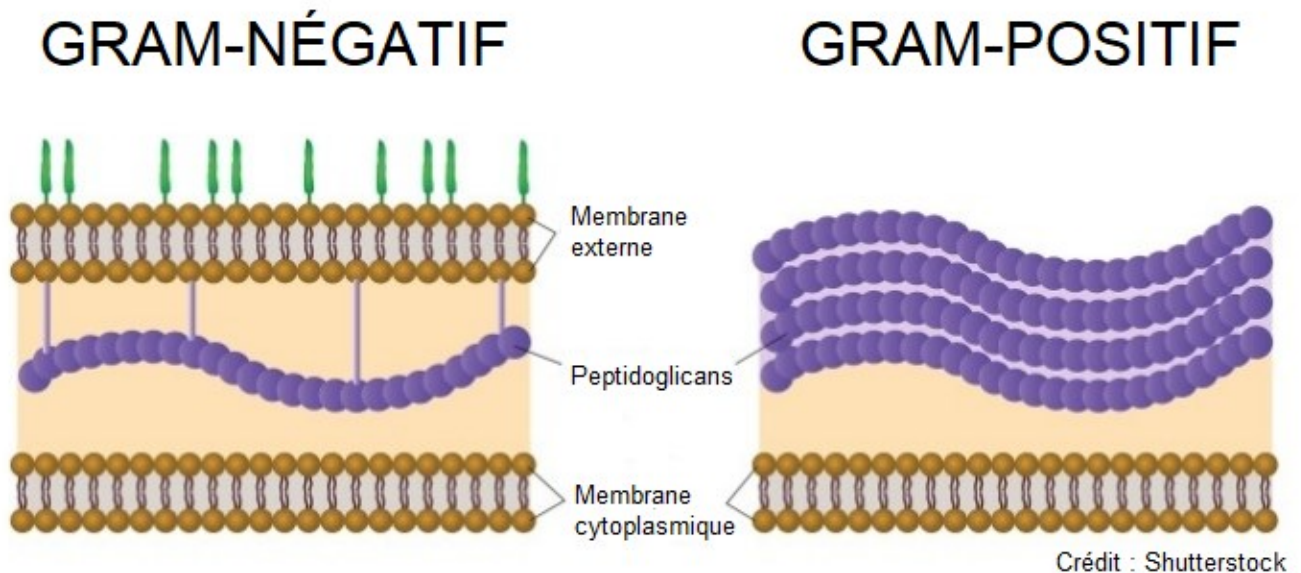


Figure 1. Deux types de paroi cellulaire bactérienne

I.1.1. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus est un type de bactérie de type Gram-positif. Son nom origine du grec *σταφυλόκοκκος* (assemblages de grappes) et du latin *aureus* (doré), car les colonies de bactéries apparaissent sous forme de sphères dorées lorsque observées sous le microscope. *S. aureus* fait partie du microbiote du corps humain, colonisant en moyenne 50% de la population mondiale, dont 20% étant des porteurs permanents et 30% des porteurs intermittents.⁵ *S. aureus* est retrouvé principalement dans le microbiote cutané humain (peau) et le tractus respiratoire. Quoique faisant partie du microbiote requis chez l'humain, il est un pathogène opportuniste, pouvant provoquer de simples infections de la peau bénignes allant jusqu'à des maladies graves comme la pneumonie et le choc septique.⁵ Ce pathogène est souvent acquis par un patient quand il est traité pour un autre problème à l'hôpital, un phénomène dénommé infection nosocomiale, causant des impacts socioéconomiques importants.^{6,7}

Ce pathogène a été découvert en 1881 par Alexander Ogston, un chirurgien écossais, qui a observé la présence d'abcès chez ses patients post-opération, toujours accompagnés de pus. En observant cette

substance jaunâtre sous le microscope, il observa la présence de microcoques, qui étaient neutralisés lors de l'application d'acide carbolique (phénol). De plus, il a réussi à isoler et cultiver ce pathogène en l'incubant dans des œufs de poule, le contenu des œufs ayant la même activité que le pus original des patients.^{8,9}

I.2. Les antibiotiques

Depuis toujours, les peuples ont cherché à remédier aux maladies en utilisant des traitements de sources naturelles, allant de l'application de miel sur les blessures, l'ingestion de plantes indigènes possédant des propriétés curatives jusqu'à l'application d'excréments humains sur celles-ci.¹⁰ Une application les plus rappelées dans l'histoire est l'application topique de pain moisi, évoqué dans des textes en Égypte, en Chine, en Grèce ancienne. La première documentation de ces traitements a été rapportée par John Parkinson (1567-1640) dans ses écrits *Theatrum Botanicum* (1640). C'est en 1676 que la première référence à des microorganismes '*animacules*' et l'étude en bactériologie a été initiée par Antonie van Leeuwenhoek en 1676.¹¹ Ce n'est qu'à la fin des années 1800 que Louis Pasteur et Robert Koch ont été capables d'établir une relation entre les maladies infectieuses et les bactéries.³

Le terme antibiotique origine du mot grec *antibiosis* (Anti : contre, versus et bios : vie). Ce terme a été implanté pour la première fois par un des étudiants de Louis Pasteur, Paul Vuillemin en 1889, qui voulait définir la relation antagonistique entre différents organismes (champignons vs bactéries, bactéries vs protozoaires).¹² Ce n'est que plus tard que le mot antibiotique a été utilisé pour décrire les métabolites naturels produits par les bactéries et champignons possédant des effets bactériostatiques (inhibant la croissance) ou bactéricides (tuant) contre les bactéries et/ou champignons.

Beaucoup d'antibiotiques peuvent être classés selon leur spectre d'activité biologique, leur origine et leur nature chimique, mais les grandes classes d'antibiotiques sont établies selon leur structure et leur fonction.¹³ Les classes majeures d'antibiotiques sont : les β -lactames, les aminoglycosides, les tétracyclines, les sulfonamides, les macrolides et les glycopeptides.

I.2.1. Les antibiotiques synthétiques

Une des premières percées dans le monde des antibiotiques a été la découverte du premier antibiotique synthétique, l'arsphénamine (*Salvarsan*, **Figure 2**). Cette molécule a été synthétisée par Alfred Bertheim dans le laboratoire du chimiste allemand Paul Ehrlich dans le cadre de la recherche d'un '*Magic bullet*' contre le traitement de la syphilis, mortelle si non traitée.¹⁴ Leur approche se basait sur la synthèse de centaines de composés à base des métaux lourds arsenic, bismuth et mercure. Évidemment, l'administration de ces composés diminuait les symptômes mais les effets secondaires étaient notables et souvent pires que la maladie traitée. Ce n'est qu'en 2005 que la vraie nature de l'arsphénamine a été identifiée par spectrométrie de masse, révélant un mélange trimérique et pentamérique du noyau arsénique.¹⁵

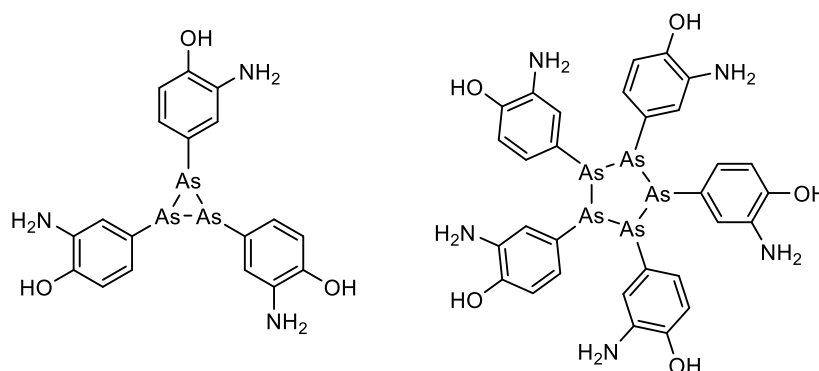


Figure 2. Isomères de l'arsphénamine (*Salvarsan*)

Pendant qu'une partie du laboratoire de Paul Ehrlich travaillait sur le développement de ces molécules contenant des métaux lourds, lui-même travaillait sur l'effet antibactérien des teintures. Ehrlich, un immunologiste, a été introduit aux techniques de coloration de cellules par son cousin, Carl Weigert, qui avait auparavant démontré que les encres à base d'aniline pouvaient être utilisées en histologie, et que ces encres possédaient la capacité de tuer les bactéries qu'ils essayaient d'imager.¹⁶ Ces travaux ont été concrétisés par la découverte de drogues basées sur les sulfonamides (*sulfa drugs*). Initialement synthétisée en 1932 par les chimistes Fritz Mietzsch et Josef Klarer dans le but initial de produire des encres, l'avènement de la découverte de la sulfamidochrysoïdine (Prontosil) a été marquante. Cette découverte a mené à sa commercialisation comme antibiotique en 1935.¹⁷ Il a plus tard été découvert que la sulfamidochrysoïdine agit comme prodrogue, et que le métabolite actif est en fait l'agent antibactérien *p*-aminophénylsulfonamide via clivage réductif du lien diazo par des diazoréductases (**Schéma 1**).¹⁸

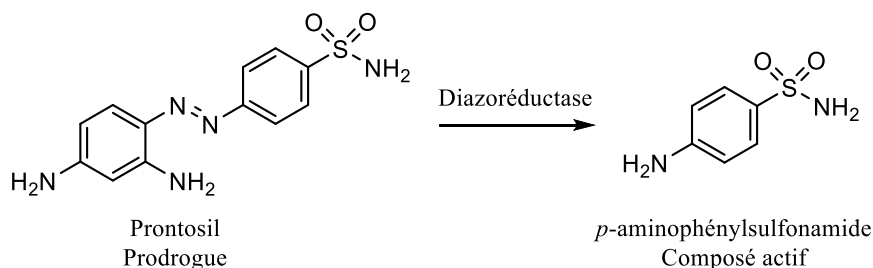


Schéma 1

Parallèlement, plus de 100 ans après la découverte de l'arsphénamine, des chercheurs ont développé des petites molécules afin de contrer plusieurs souches de pathogènes multirésistants. Le groupe le plus tristement célèbre de ces pathogènes multirésistants qui inquiètent les autorités sanitaires est maintenant nommé le groupe *ESKAPE* (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*), reconnus comme les 6 pathogènes les plus problématiques actuellement.¹⁹ L'utilisation de molécules organiques naturelles contre ces pathogènes a amené à l'apparition de mutants chez presque toutes ces dernières, produit de la grande capacité d'adaptation des bactéries.²⁰ Le développement d'antibiotiques synthétiques est une façon de contourner ces problèmes, présentant aux pathogènes des molécules auxquelles ils n'ont jamais été exposés et utilisant des mécanismes d'action qui n'ont pas encore été exploités par d'autres antibiotiques, diminuant ainsi le potentiel de mutations vers des souches résistantes. Ces molécules sont par exemple basées sur des complexes de coordination et offrent des concentrations inhibitrices minimales jusqu'à $< 2\text{-}4 \mu\text{g} / \text{mL}$ sur les pathogènes du groupe *ESKAPE*. La stratégie utilisée par les chercheurs se base sur la livraison de complexes inorganiques à base de phosphore et tungstène chez les microorganismes (**Figure 3**).²¹

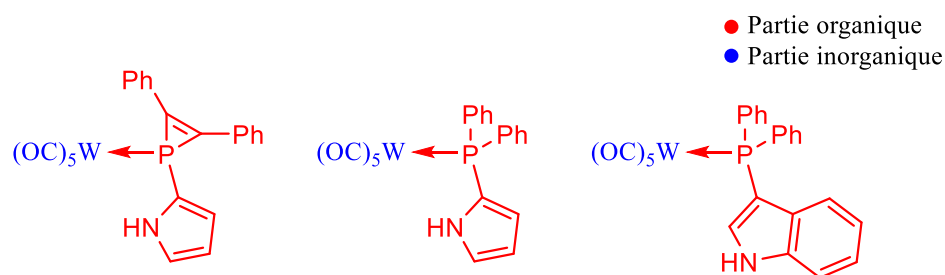
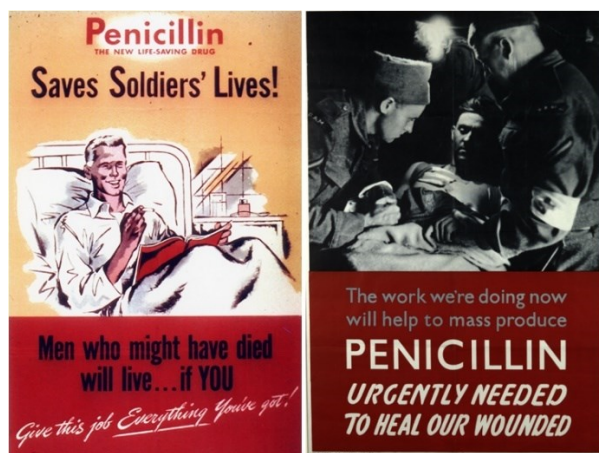


Figure 3. Molécules antibiotiques inorganiques développées par Sterenberg *et al.*

I.2.2. Les antibiotiques issus de produits naturels

I.2.2.1. Les β -lactames

La découverte de la pénicilline est un point tournant dans l'histoire de la médecine moderne. Alors de retour de vacances, Alexandre Flemming, un bactériologiste travaillant à l'hôpital St-Mary's à London, a découvert un pétri exposé à l'air ambiant contenant une colonie de *Staphylococcus aureus* contaminée par un champignon, *Penicillium chrysogenum*. Une inhibition de croissance de *S. aureus* se produisait près de *P. chrysogenum* tandis que le reste du pétri semblait non affecté. Ceci a incité le bactériologiste à isoler la substance sécrétée par le champignon, qui a été nommée pénicilline en 1929.²² Ce n'est qu'au début des années 1940 que l'antibiotique a été utilisé pour la première fois chez les soldats américains pendant la 2^e guerre mondiale (**Figure 4**). C'est après la fin de la guerre, en 1945, que la structure exacte de la pénicilline a été élucidée par Dorothy Hodgkin par cristallographie de rayons X²³, et a donc été classifiée comme la première molécule dans la famille des β -lactames. La première synthèse totale



Crédit : Office for Emergency Management, 1945

Figure 4. Affiches portraying les bienfaits de la pénicilline entre 1939 et 1945

d'un membre de la famille des pénicillines (pénicilline V) a été complétée par John Sheehan en 1957, et s'effectue en 8 étapes linéaires avec un rendement global de 1.5%.²⁴ Sa biosynthèse s'effectue à partir des acides aminés L-cystéine, L-valine et un dérivé de la L-lysine, l'acide α -aminoadipique (**Schéma 2**).²⁵ N'ayant pas encore accès à une voie synthétique dans ce temps, l'accès à des grandes quantités des pénicilline s'est donc basée initialement sur la culture massive de *P. chrysogenum* dans des fermenteurs afin de subvenir à la demande du nouvel antibiotique. La puissance des β -lactames se trouve dans leur pouvoir bactéricide, passant par un mécanisme impliquant l'inhibition de l'enzyme D-alanyl-D-alanine

carboxypeptidase de type sérine. Cette enzyme est cruciale à la formation de la couche de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne, et est inhibée par l'acylation irréversible de l'enzyme du cycle tendu de la β -lactame.²⁶

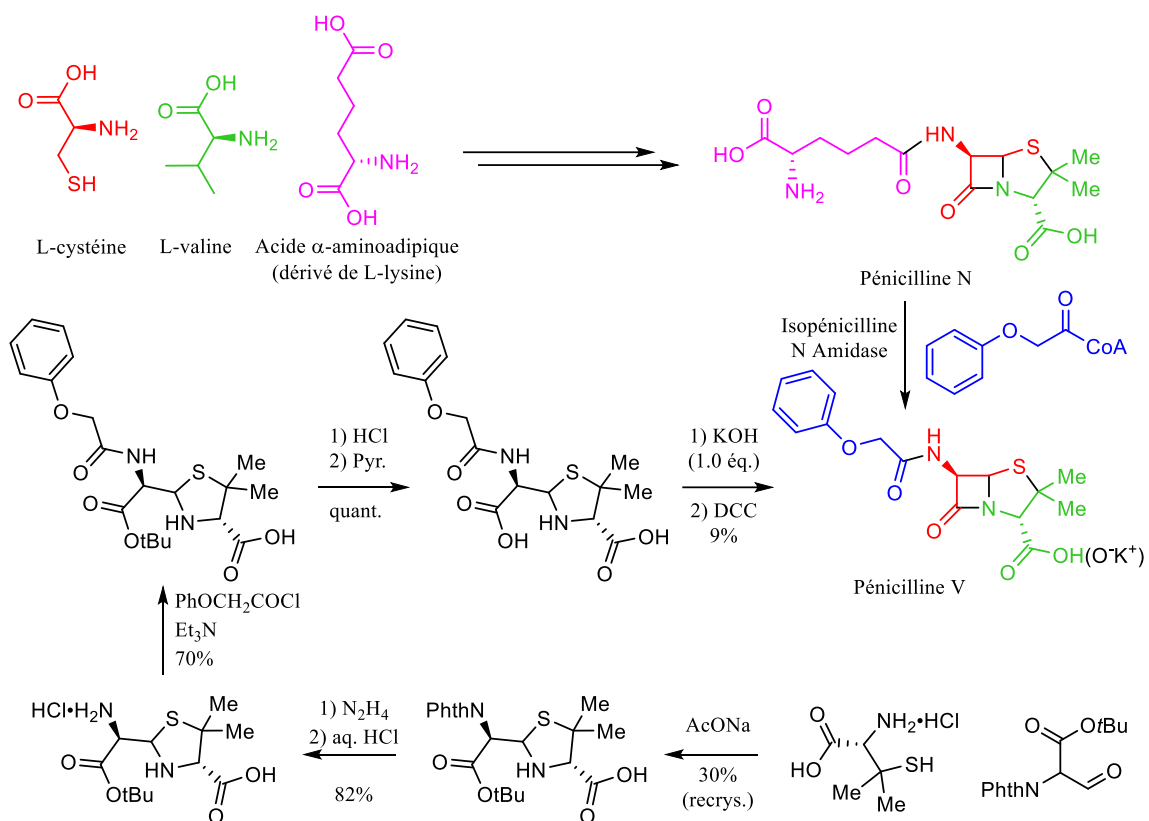


Schéma 2

I.2.2.2. Les aminoglycosides

Une autre grande découverte dans le monde de la médecine moderne a été l'isolation du premier aminoglycoside, la streptomycine, produite par la bactérie *Streptomyces griseus* en 1944 par Albert Schatz et Selman Waksman.²⁷ Cette découverte était très importante, car en plus d'être active sur les bactéries à Gram positif, la streptomycine était aussi active sur certains types de bactéries à Gram négatif et sur les souches *Mycobacterium tuberculosis* (souche invisible au test de coloration de Gram).²⁸ Cette découverte était cruciale, car l'antibiotique le plus puissant connu dans le temps (la pénicilline) n'était pas active contre la tuberculose. La découverte de cette nouvelle classe d'antibiotiques a donc mené au traitement initial de la tuberculose, méritant le prix Nobel de la médecine à Waksman en 1952. La structure de la streptomycine a été élucidée 24 années après sa

découverte en 1968 par cristallographie²⁹ et sa première synthèse totale complétée en 1974 par Umezawa *et al.*³⁰ Sa structure, composée de trois unités de sucres, a comme précurseur commun le glucose-6-phosphate. Ces unités sont ensuite assemblées séquentiellement par des enzymes (**Schéma 3**).³¹ Le mécanisme d'action bactéricide des aminoglycosides implique l'inhibition de la biosynthèse des protéines bactériennes par liaison à la sous-unité 30S du ribosome procaryote.³²

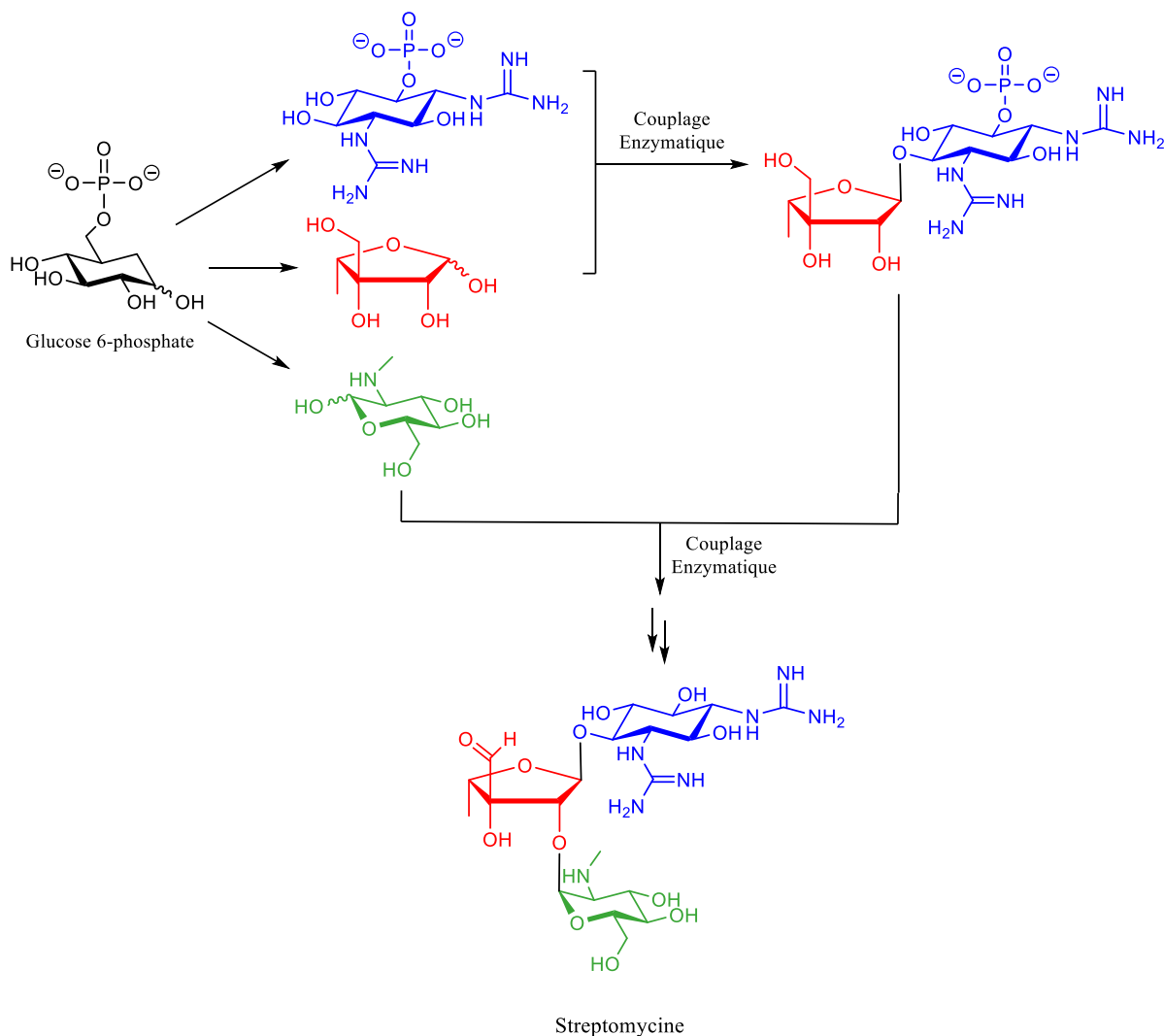


Schéma 3

L'aminoglycoside gentamicine est l'antibiotique utilisé dans le traitement des infections par *S. aureus*. Ce dernier, connu pour sa capacité à développer des résistances, utilise le mécanisme non spécifique de persistance et peut générer des variants en petites colonies. Par le même mécanisme d'action que la streptomycine, la gentamicine (**Figure 5**) inhibe la biosynthèse des protéines bactériennes.

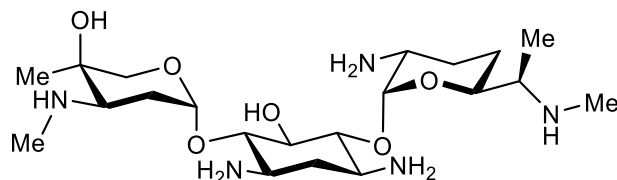


Figure 5. Structure de la gentamicine

I.1.2. Les mécanismes de résistance chez les bactéries^{33,34}

I.1.2.1. Modifications de l'antibiotique

Une des stratégies les plus efficaces des bactéries pour faire face à la présence d'antibiotiques est la production d'enzymes qui 'inactivent' la drogue, diminuant ou tuant complètement son potentiel antibiotique. Ce mécanisme est observé autant chez les bactéries Gram-positif que Gram-négatif. L'altération chimique de la drogue souvent observée lors de traitement, par exemple, par des aminoglycosides (AMG) s'effectue via des *aminoglycoside modifying enzymes* (AME), qui effectuent soit une acétylation (acetyltransferase [ACC]), la phosphorylation (phosphotransferase [APH]) et l'adénylation (adényltransferase [ANT]).^{35,36}

Un autre mécanisme prévalent dans cette catégorie est la destruction de l'antibiotique. Ceci est notamment observé chez les β -lactames. La principale source de résistance chez cette catégorie d'antibiotiques est la création de β -lactamases, métabolisant ainsi l'antibiotique avant qu'il ne puisse affecter la bactérie.³⁷ Jusqu'à maintenant, plus de 1000 β -lactamases ont été décrites dans la littérature scientifique, preuve que ce mécanisme est prévalent. Sa découverte remonte quelques années avant la découverte de la pénicilline (**Figure 6**) et des chercheurs en épigénétique ont réussi à tracer leur existence à plusieurs millions d'années.³⁸ Un moyen utilisé afin de surpasser ce problème a été d'utiliser une nouvelle classe d'antibiotiques β -lactames synthétiques à spectre large contournant les pénicillinases (e.g. ampicilline), mais des β -lactamases ont rapidement évolué pour contourner cette transformation, ramenant les chercheurs à la case départ.³⁹ Finalement, un moyen de potentialiser l'activité antibiotique de la pénicilline a été de développer des inhibiteurs de β -lactamases (acide clavulanique, sulbactam) qui seraient administrés en synergie avec la pénicilline.³⁸

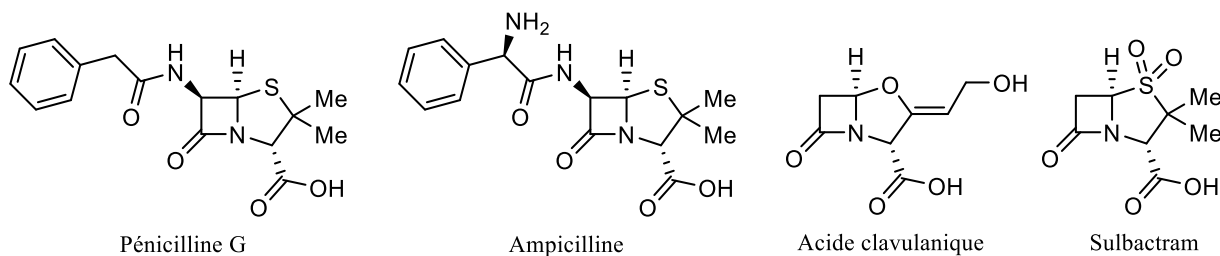


Figure 6. β -lactames et inhibiteurs de β -lactamases

I.1.2.2. Diminution de la pénétration intracellulaire

Plusieurs antibiotiques utilisés de nos jours ont des cibles intracellulaires, dans le cas des bactéries de type Gram-négatif, qui se situent dans la membrane cytoplasmique. Le composé doit donc pénétrer la cellule afin d'obtenir l'effet thérapeutique voulu. Il a été observé que les bactéries avaient la capacité de réduire l'habileté des antibiotiques à passer la paroi cellulaire, limitant l'influx de molécules externes dans la cellule. Les molécules grasses telles que les β -lactames, tétracyclines et fluoroquinolones sont plus affectées par ce changement de perméabilité de la membrane, car elles utilisent souvent des canaux connus sous le nom de porines afin de traverser cette barrière.⁴⁰ En régulant la structure et l'expression génique de ces porines, les bactéries modulent l'influx de molécules dans leur milieu intracellulaire, similaire au fait de changer une serrure sur une porte.

La modulation des mécanismes d'efflux des cellules constitue aussi un moyen utile d'excréter rapidement les composés toxiques des cellules. Le premier mécanisme d'efflux d'antibiotiques a été décrit en 1980 lors de traitement de *E. coli* par des tétracyclines.⁴¹ Ces composés sont sélectivement excrétés vers le milieu extracellulaire à une plus grande vitesse qu'ils ne peuvent être incorporés, empêchant l'effet thérapeutique voulu de s'effectuer. Ce mécanisme a été observé chez les bactéries Gram-positif et Gram-négatif, et peut être spécifique à un médicament ou un mécanisme multidrogue⁴² (toute molécule organique exogène). Il est principalement rencontré lors du traitement par des molécules hydrophobes telles que les tétracyclines^{43,44} et les macrolides.⁴⁵

I.1.2.3. Altérations de la cible

Une stratégie de protection contre les antibiotiques couramment utilisée par les bactéries est la protection du site actif. Un exemple beaucoup étudié est le mécanisme de protection chez les bactéries résistantes aux tétracyclines, qui ciblent le ribosome. Une série de protéines GTPases (Tet[M], Tet[O])

ont été identifiées comme étant des déterminants dans la résistance aux tétracyclines, ces dernières interagissant avec le ribosome cible et délogant la tétracycline de son site d'action de manière GTP-dépendante.⁴⁶ En conséquence, la conformation ribosomale est modifiée, et subséquemment, la tétracycline est donc incapable de retourner au site actif.⁴⁶ Ce mécanisme de résistance est aussi rencontré par des bactéries ciblées par des quinolones.⁴⁷

L'introduction de modifications au site actif est l'un des mécanismes les plus rencontrés lors du phénomène de résistance bactérienne, affectant presque toutes les familles d'antibiotiques. Le site actif peut être altéré via des mutations des gènes codant pour la protéine portant le site actif, via des altérations enzymatiques des sites actifs (e.g. méthylation), ou via le remplacement des cibles originales. Ces mécanismes ont tous le même effet : diminuer l'affinité de l'antibiotique avec son site actif. Par exemple, les gènes *erm* (erythromycin ribosomal methylation) codent pour une enzyme responsable de la méthylation de la sous unité ribosomale 50S, cible des macrolides et des lincosamides. Ces méthylations réduisent l'affinité de ces molécules pour leur site actif, altérant leur activité biologique.⁴⁸ Bien que ces mécanismes affectent également les fonctions biologiques normales de la bactérie, il semble que cette dernière ait plus à gagner via la résistance aux antibiotiques.

I.1.3. La résistance chez *Staphylococcus aureus*

Depuis sa découverte, *S. aureus* a été le sujet de beaucoup de recherches afin de pouvoir ultimement contrer cette bactérie très adaptative. La résistance chez ce pathogène implique principalement le transfert de gènes, HGT (*Horizontal Gene Transfer*), et la mutation chromosomale. En plus de ces mécanismes de résistance non-spécifiques, ce pathogène est capable d'adopter un phénotype de type biofilm, lui permettant de résister aux conditions anaérobiques. Il est intéressant d'observer qu'un récent aperçu de la littérature⁴⁹ démontre que l'intérêt de recherche sur les infections à *S. aureus* a été prédominant sur les autres infections (*E. coli*, *P. aeruginosa*, etc.) depuis le milieu des années 1980 (**Figure 7, A**), illustrant la gravité du besoin médical. Il est aussi intéressant d'observer un déclin mineur de la résistance chez SARM entre 2005 et 2011 (**Figure 7, B**), qui autrement est à la hausse depuis son apparition. L'intérêt général de l'intérêt en recherche sur la résistance à la méthicilline est fortement liée à l'intérêt de recherche de *S. aureus* (**Figure 7, C**).

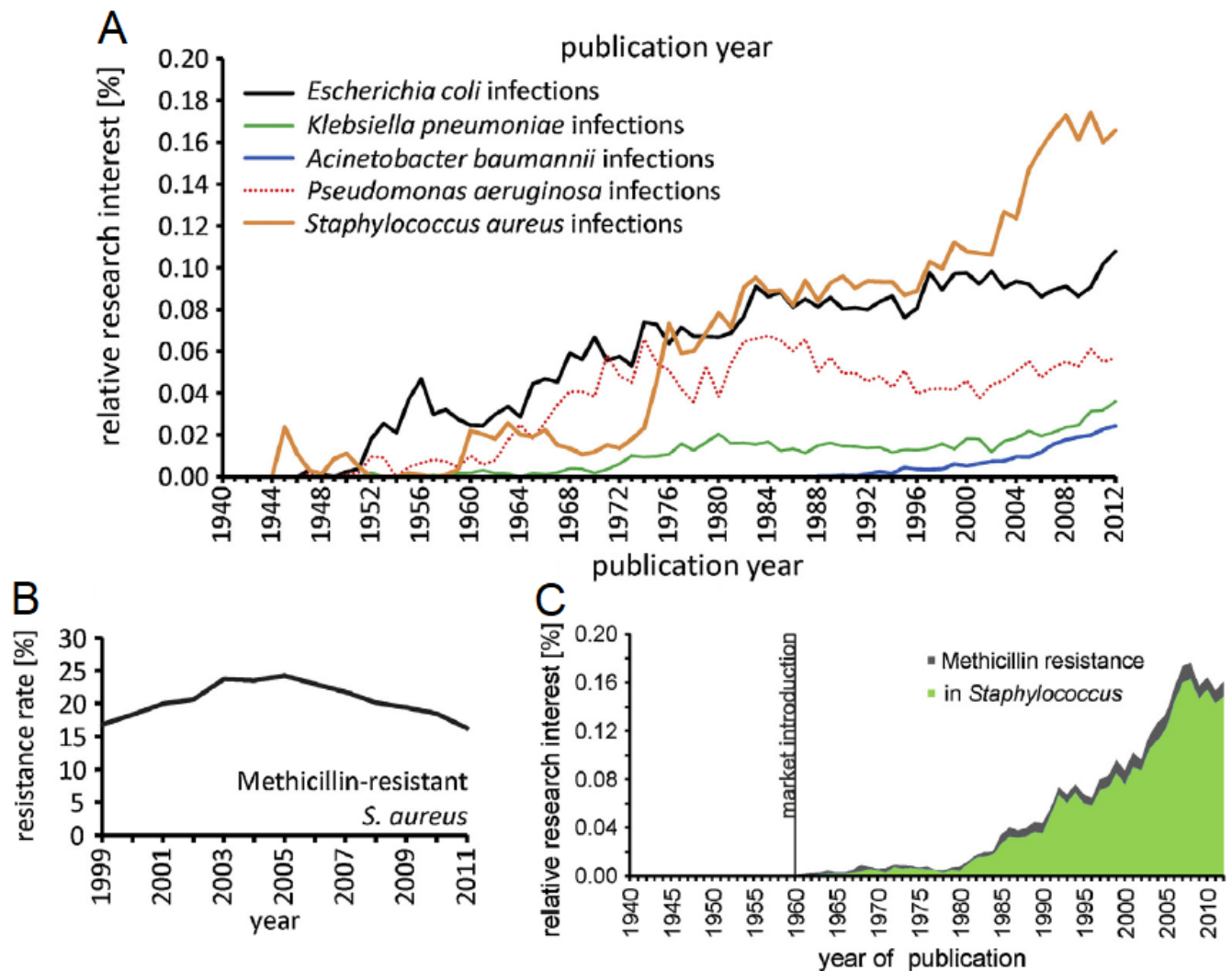


Figure 7. Statistiques de recherche sur *S. aureus*

1.1.3.1. Les souches résistantes de *Staphylococcus aureus*

S. aureus est un pathogène capable de s'adapter rapidement à son environnement, possédant les outils pour développer rapidement des résistances aux antibiotiques présents. Les souches résistantes subséquentes sont la conséquence du HGT (le mouvement latéral de l'information génétique entre les organismes présents dans le même environnement), créant des mutations génétiques, un mécanisme de défense bactérien. Plus souvent qu'autrement, HGT permet le développement de souches résistantes sans un besoin de mutation génétique de la bactérie, ce qui le rend très adaptatif à son environnement.⁵⁰ Seulement quelques années après l'introduction de la pénicilline, le *S. aureus* résistant à la pénicilline (SARP) a fait son apparition. Ces souches produisent des pénicillinases, des enzymes capables

d'hydrolyser la tête réactive de la pénicilline (β -lactame), rendant l'antibiotique inactif. Vers la fin des années 1950, plus de 90% des souches de *S. aureus* étaient résistantes à la pénicilline⁵¹, posant un défi de santé majeur car le meilleur antibiotique connu à l'époque était maintenant désuet. Dans un effort pour contrer la résistance à la pénicilline, la méthicilline a été introduite en 1959. La méthicilline comporte une fonction aryle plus large, qui a été conçue pour réduire son affinité pour les pénicillinases (**Figure 8**).⁵² Malheureusement, les premières souches de *S. aureus* résistant à la méthicilline (SARM) ont été reportées seulement deux années après sa découverte, en 1961. Contrairement au SARP, où la résistance origine de l'inactivation de l'antibiotique (hydrolyse du β -lactame), la résistance au SARM est due à une modification de sa cible, modifiée par la protéine PBP2a (*Penicillin-binding protein 2a*), qui renforce la formation de peptidoglycans extracellulaires en bloquant simultanément la liaison des β -lactames à ces derniers.⁵²

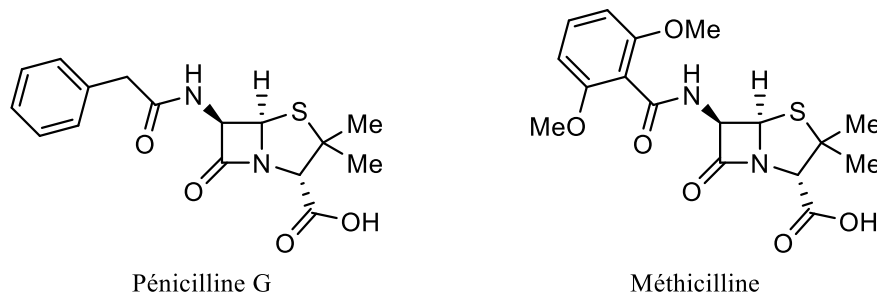


Figure 8. Comparaison entre la pénicilline et la méthicilline

L'incapacité des β -lactames à maintenant tuer les différentes souches de *S. aureus* a mené à l'utilisation de la vancomycine (**Figure 9**), un glycopeptide originalement isolé d'*Amycolatopsis orientalis* en 1958, considéré comme l'antibiotique le plus puissant connu de l'homme. Cet antibiotique fonctionne aussi comme inhibiteur de biosynthèse des parois cellulaires chez les bactéries. Les premières souches de *S. aureus* résistant à la vancomycine (SARV) ont été rapportées au début des années 2000.⁵³

1.1.3.2. Les variants à petite colonies et le biofilm

Parmi les mécanismes de résistance spécifique au pathogène (mutations), un mécanisme de défense non-spécifique est aussi un moyen que les bactéries emploient afin de survivre à leur environnement hostile (incluant la présence d'antibiotiques, qui constituent ni plus ni moins une pression évolutive menant à la sélection des organismes résistants). Une défense bactérienne non-spécifique prévalente est la génération du phénotype réversible de variants à petites colonies (SCV). Ce phénotype persistant est

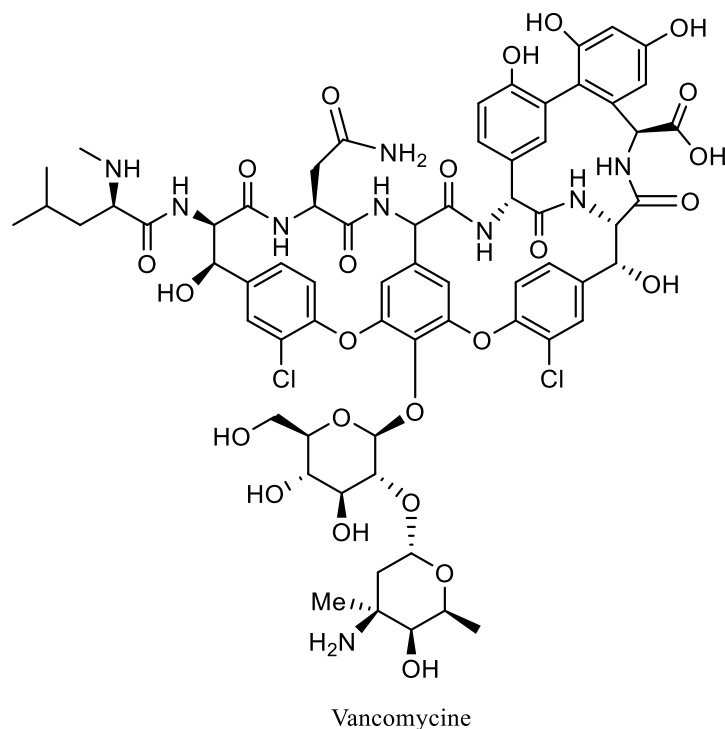


Figure 9. Structure de la vancomycine

caractérisé par une croissance bactérienne plus lente, il est non-hémolytique, possède un milieu anaérobie et coexiste avec ses souches sauvages (*wild-type*). Ce phénotype est présent seulement à environ 1% en coexistence avec les souches sauvages (**Figure 10**). La présence de ce phénotype persistant limite l'efficacité des antibiotiques, qui se basent sur des processus cellulaires actifs.^{54,55} Les SCV possèdent une chaîne respiratoire déficiente, conséquence de leur force proton-motrice diminuée, qui affecte négativement l'influx cellulaire des antibiotiques qui nécessitent un gradient de protons afin d'entrer ou sortir de la cellule.⁵⁶ Les variants à petites colonies sont également associés à la formation de biofilm. Les biofilms sont composés principalement d'oligosaccharides (polymères de *N*-acétyl- β -(1-6)-glucosamine), d'ADN, de protéines AAP (*Accumulation-associated protein*) et d'acide teichoïque⁵⁷, et ont comme but ultime la défense de la colonie contre des chocs tels qu'un environnement sec, la chaleur et la pénétration des antibiotiques.

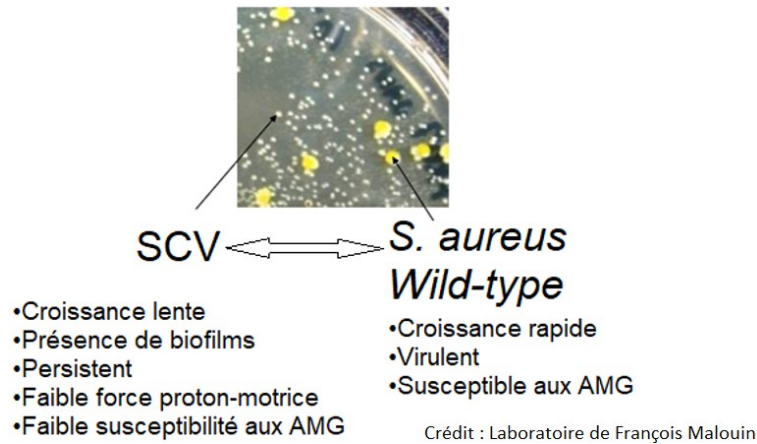


Figure 10. Relation entre les souches *Wild-type* et SCV de *S. aureus*

Les SCV sont souvent reliés aux infections chroniques : dans les poumons des patients souffrant de Fibrose kystique (FK), d'ostéomyélite ou d'arthrose septique.^{58,59} et aux procédures chirurgicales telles l'implantation de cathéters, de valves cardiaques prosthétiques ou de *pace-makers*.⁶⁰ De plus, la combinaison de plusieurs pathogènes chez un patient affecte l'équilibre réversible entre *S. aureus* et ses SCV. Par exemple, la présence de *P. aeruginosa* chez les patients souffrant de fibrose kystique rend le traitement de *S. aureus* plus difficile car cette synergie promeut le phénotype SCV chez cette dernière. *P. aeruginosa* sécrète la molécule *N*-oxyde de 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinolone (HQNO), un inhibiteur de quinolones⁶¹ et inhibiteur de la chaîne respiratoire des cellules bactériennes. Chez *S. aureus*, cette molécule favorise la mutation vers le phénotype SCV grâce à la création d'un milieu anaérobie, menant ainsi à la production de biofilms, rendant le traitement contre *S. aureus* plus difficile.⁶²

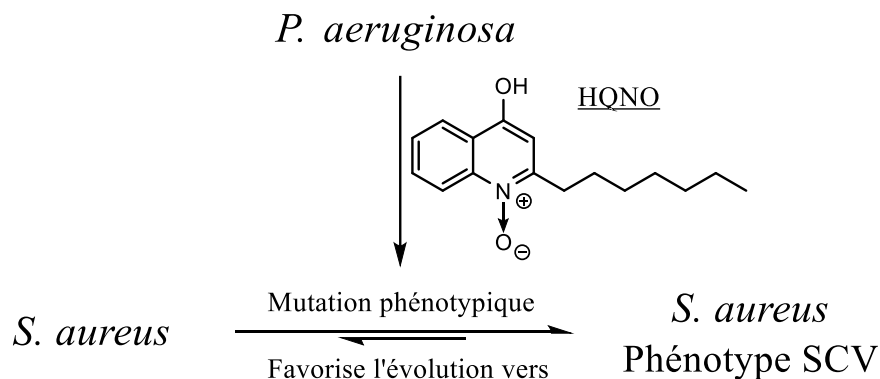


Figure 11. Facteurs favorisant le phénotype SCV lors de la cohabitation avec *P. aeruginosa*

I.3. La tomatidine

La tomatidine **1** (**Figure 12**) est un alcaloïde stéroïdien appartenant à la classe des sapogénines, retrouvé dans plus de 60 plantes de culture (patates, tomates, aubergines, etc.) appartenant au génome *Solanum*.⁶³ Cette dernière a été isolée pour la première fois en 1948 sous sa forme naturelle tomatine **2**, glycosylée en position 3 par le tétrasaccharide Gal-Glu(Glu-Xyl), et sa structure subséquemment élucidée par diffraction des rayons X.^{64, 65}

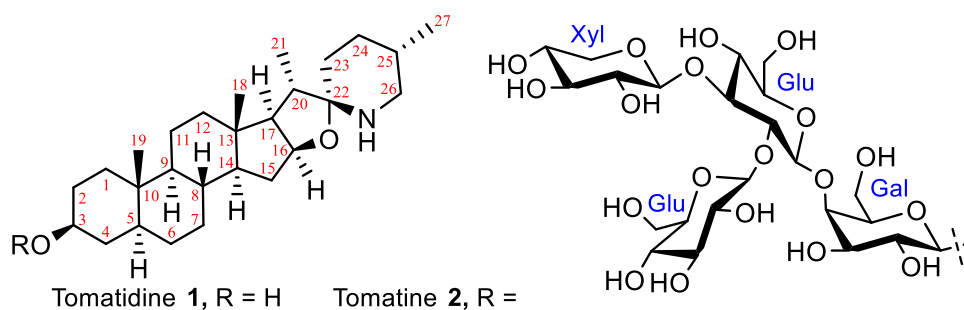


Figure 12. Structures de la tomatine et la tomatidine

I.3.1. Biosynthèse et sources naturelles

La biosynthèse de la tomatidine est initiée par la transformation du phytocholestérol. Le cholestérol végétal est biosynthétisé via la voie isoprénoïde mévalonique via HMG-CoA, confirmée par plusieurs études de marquage isotopique.^{66,67,68,69} De plus, une étude par marquage isotopique au cholestérol tritié (³H) a confirmé la transformation biosynthétique vers la tomatidine (**Schéma 4**).⁷⁰ Suite à la biosynthèse de l'alcaloïde, l'enzyme glycosyltransférase *SGT1* effectue l'arrimage de la première unité galactose sur l'alcool en position 3 de la tomatidine, puis l'enzyme glycostérol rhamnosyltransférase *GRT1* arrime les trois autres unités saccharides afin d'obtenir le lycotétraose et générer la tomatine **2**.^{71, 72, 73, 74}

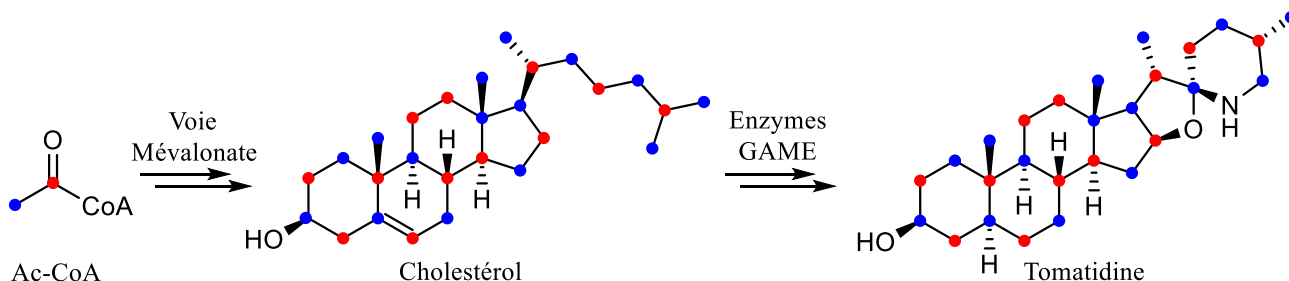


Schéma 4

Suite à la biosynthèse du cholestérol, une série d'enzymes GAME (**GLYCOALCALOID METABOLISM**) se chargent de la synthèse de plusieurs glycoalcaloïdes dans les plants de tomate, patate et aubergines, dont **1** (Schéma 5).^{75,76}

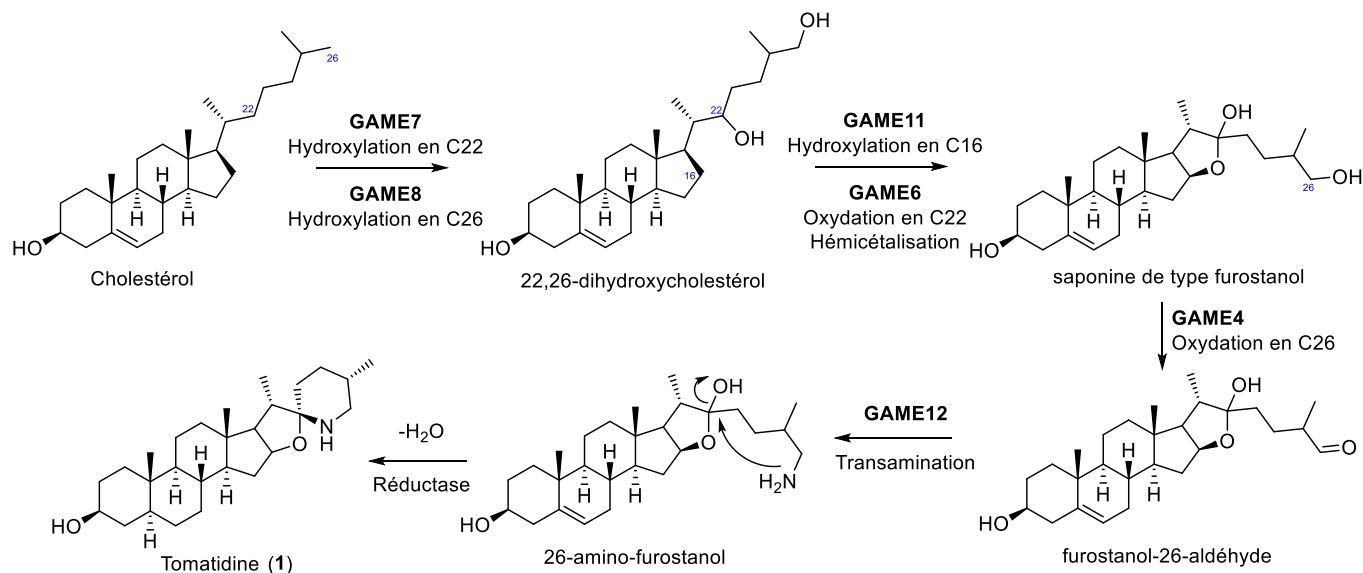


Schéma 5

I.3.2. Activité biologique de la tomatine et la tomatidine

Du point de vue évolutif, les glycoalcaloïdes stéroïdiens sont des métabolites produits par les *Solanaceae* afin de procurer des défenses contre les pathogènes et les prédateurs incluant les bactéries, fongicides, oomycètes, virus, insectes et animaux.⁷⁷ Les glycoalcaloïdes stéroïdiens sont considérés ainsi comme des composés antinutritionnels et toxiques pour les animaux⁷⁸. Un composé antinutritionnel est défini comme une substance qui induit une inactivation de certains nutriments et diminue le processus digestif et métabolique des nutriments nécessaires aux animaux.⁷⁹ De plus, la tomatine a précédemment été reconnue pour inhiber la croissance de cellules cancéreuses du poulmon, du colon, du foie et de l'estomac.^{80,81}

Au début des années 2010, les groupes de recherche Malouin et Bouarab ont découvert que la tomatidine possédait aussi un pouvoir potentiateur des antibiotiques de la classe des aminoglycosides dans le traitement des bacillales, ainsi qu'une activité antibiotique propre contre les variants à petites colonies (*Small Colony Variants, SCV*) de *Staphylococcus aureus* et autres bactéries de la classe des

bacillales.^{82,83} Des essais *in vitro* ont confirmé que l'activité de celle-ci était nulle lorsque utilisée seule contre les souches sauvages de *S. aureus*. L'utilisation de la tomatidine en conjonction avec l'aminoglycoside gentamicine (**Figure 5**) diminue la concentration minimale inhibitrice de cette dernière (CMI) de 1 µg / mL à 0.06 µg / mL contre les souches sauvages de *S. aureus*.

Au niveau de la chimie, une bonne partie du travail précédent a été consacré à l'étude de relation structure-activité de la tomatidine contre les SCV de *S. aureus* par Félix Chagnon en 2014.⁸⁴ L'effort de modification de l'alkaloïde stéroïdien a permis d'augmenter l'activité envers les souches sauvages de *S. Aureus* de >64 µg / mL à 8-16 µg / mL avec le composé le plus puissant (FC04-100) mais ce dernier ne reste pas plus efficace que la tomatidine contre les SCV (0.25 µg / mL pour FC04-100 vs 0.06 µg / mL pour TO). Dans ce temps, la cible cellulaire de TO n'était pas connue, et les auteurs utilisaient donc des essais phénotypiques (inhibition de la croissance bactérienne) afin de caractériser l'action des composés. Peu de temps après ces travaux, la sous unité c de l'ATP synthase de *Staphylococcus aureus* a été identifiée comme la cible de la tomatidine, inhibant donc sélectivement (versus l'ATP Synthase mitochondriale) la production d'énergie chez les bactéries.⁸² À l'heure actuelle, un seul antibiotique ciblant l'ATP synthase a été mis en marché, la bédaquiline, qui inhibe sélectivement l'ATP synthase de *Mycobacterium tuberculosis*. La bédaquiline (**Figure 13**), qui n'inhibe ni l'ATP synthase de *S. aureus*

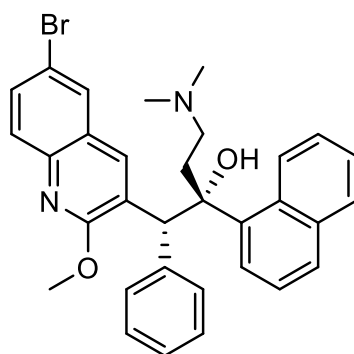


Figure 13. Structure de la bédaquiline

ni celle des mitochondries, est utilisée cliniquement dans le traitement de la tuberculose.⁸⁵ Afin d'exploiter l'utilisation de la tomatidine et de ses dérivés dans le traitement des infections persistantes à *S. aureus*, les groupes Malouin et Marsault ont besoin de grandes quantités de tomatidine. Malheureusement, le prix de cette dernière (1000-2000\$ / g) est prohibitif pour une utilisation à grande échelle. La poursuite d'un accès synthétique de cette molécule a donc été entreprise.

I.3.3. Synthèses précédentes de produits naturels possédant la fonction spiroaminocétale

La fonction spiroaminocétale est peu fréquente et est rarement rencontrée chez les alcaloïdes. Cette fonction, aussi connue sous le nom d'oxazaspirocétal et spiro-N,O-cétal, consiste en un atome de carbone central qui relie deux cycles, mis en évidence par dénotation «Spiro» (du latin *spira*, qui signifie «torsion»). Un de ces cycles comporte un atome d'oxygène alors que le second comporte un atome d'azote. Naturellement, cet atome de carbone est stéréogénique, et peut donc résulter en deux diastéréoisomères dépendant des groupements fonctionnels qui fonctionnalisent chaque cycle. Des méthodologies qui ont précédemment mené à des molécules naturelles comportant la fonction spiroaminocétale ont été étudiées afin de construire une base de connaissances qui ont permis d'effectuer une analyse rétrosynthétique de la tomatidine.

I.3.3.1. Pandamarilactone 1

La pandamarilactone-1 **3** (**Figure 14**) est un alcaloïde isolé de pins des régions tropicales et subtropicales au sud-est de l'Asie (Philippines, Malaisie) et en Australie. Il est isolé des pins de la famille des *Pandanaceae*, du génus *Pandanus*, qui contient environ 700 espèces.⁸⁶ Beaucoup de plantes de *Pandanus* sont utilisées en médecine traditionnelle, dont les feuilles de *P. amaryllifolius*, plus connu sous le nom de 'pin à vis parfumée', utilisées pour rafraîchir le corps. L'isolation des produits de la feuille de *P. amaryllifolius* a mené à la découverte et l'identification de la pandamarilactone 1 en 1993.⁸⁷

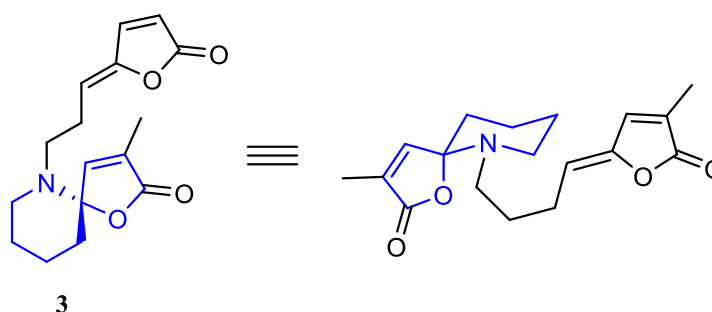


Figure 14. Structures 2D et 3D de la Pandamarilactone-1

La première synthèse de **3** a été réalisée en 2014 par *Robertson et al.* en Angleterre.⁸⁸ Les auteurs se sont basés sur une approche biomimétique (**Schéma 6**), passant par la cyclisation du dicétal symétrique **6**, construit initialement par les fragments amine **4** et aldéhyde **5**, suivie d'étapes de protection, de

déprotection et oxydation des noyaux furanes. Le composé **6** a par la suite été soumis à un acide de Brønsted dilué en mode biphasique. L'oxonium **7**, largement stabilisé par la cétone α,β -insaturée, a été généré par l'expulsion d'une molécule de MeOH, ensuite piégé intramoléculairement par l'amine du substrat. Ce substrat a enfin été transformé en une étape pour donner la pandamarilactone **1** sous forme d'un seul diastéréoisomère au niveau du centre spiro.

La dernière étape de cette synthèse a consisté en l'élimination du deuxième cétal pour donner le produit naturel **3**. Les auteurs ont essayé d'arriver au produit **3** directement en soumettant le dicétal **6** à 2.0 équivalents d'acide, mais n'ont obtenu le produit final qu'avec un rendement de 12%. Les réactions séquentielles de transformation de **6** à **8**, puis de **8** à **3**, se sont donc avérées plus efficaces (33% et 66% respectivement). Cette synthèse a été réalisée par la génération d'un oxonium qui a ensuite été piégé intramoléculairement par une amine adjacente.

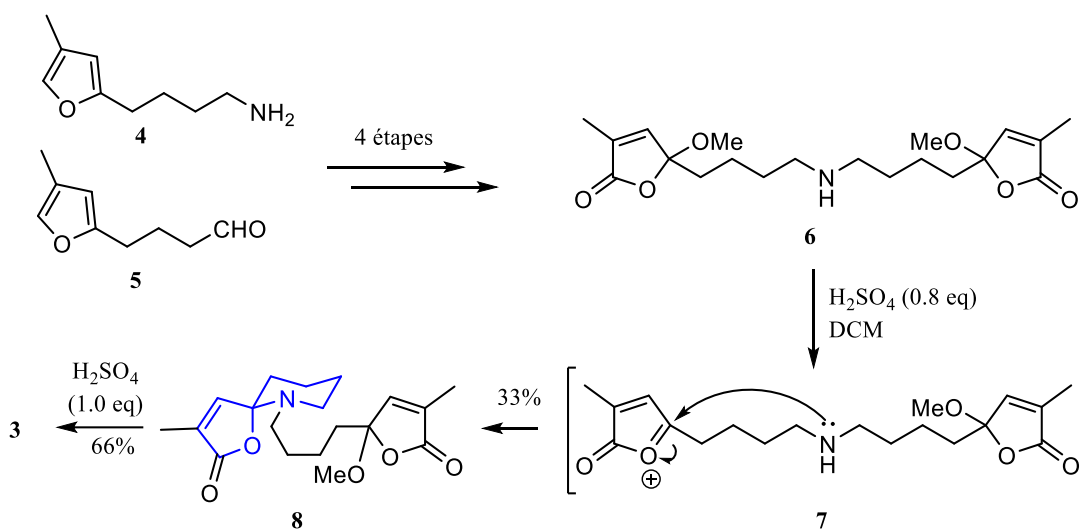


Schéma 6

1.3.3.2. Azaspiracide-1

Les Azaspiracides (AZA) sont des neurotoxines marines découvertes et isolées suite à de nombreux cas d'empoisonnements alimentaires liés à la consommation de moules bleues (*Mytilus edulis*), causant une dizaine de décès initialement en 1995 au Pays Bas.⁸⁹ Ce n'est que trois années plus tard, en 1998, que l'(-)-Azaspiracide-1 **9** (Figure 15) a été isolée et initialement caractérisée par Satake *et al.*⁹⁰ Une révision majeure de sa structure a été effectuée et confirmée par synthèse totale par Nicolaou *et al.* en 2004.⁹¹

Depuis leur découverte, les toxines AZA ont été isolées dans de multiples espèces de moules, huitres, pétoncles, palourdes et coques, amenant au total 11 analogues naturels.^{89,92} L'azaspiracide-1 **9** est une structure nonacyclique comportant deux grands domaines, ABCDE et FGHI. La synthèse totale de (-)-**9** a donc été séparée en la préparation de ces 2 fragments par le groupe de recherche de Nicolaou.⁹¹

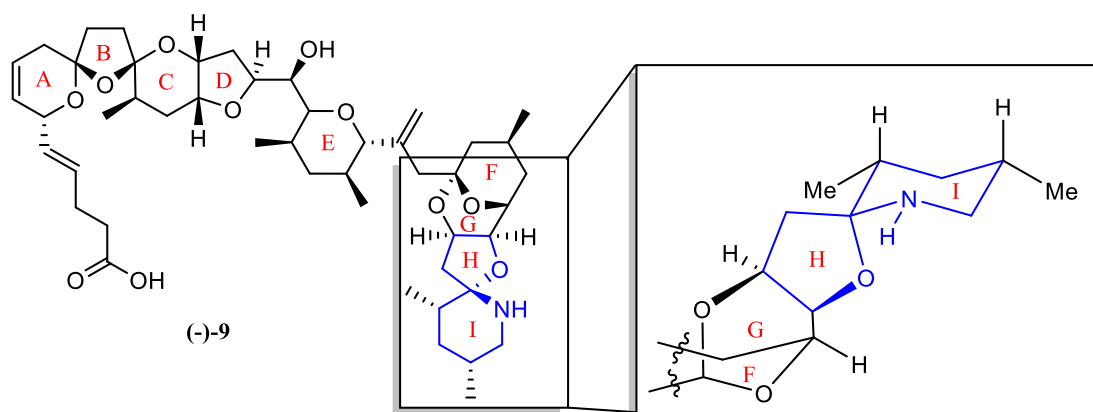


Figure 15. Structure 2D de l'(-)-azaspiracide-1 **9** et sa fonction spiroaminocétale en 3D

En 2008, *Evans et al.* ont complété la synthèse totale de (+)-**9** par synthèse convergente en joignant les fragments ABCD et EFGHI en fin de synthèse.⁹³ La formation du spiroaminocétal a été initiée par une séquence de déprotection du céto-alcool protégé **10** (Schéma 7) et cyclisation spontanée sur silice pour donner l'hémicétal **11**. L'azoture adjacent a ensuite été réduit catalytiquement par H_2 - Pd/C pour générer l'amine **12** *in situ*, qui a spontanément cyclisé pour donner le spiroaminocétal **13** thermodynamique en un seul diastéréoisomère (>95 : 5 d.r.). La réduction de Staudinger, quant à elle, a donné un mélange de diastéréoisomères. Ces deux transformations ont mené à la formation successive des cycles H et I en deux étapes.

Evans et al. ont été les seuls à utiliser la stratégie de cyclisation spontanée d'amine sur un hémicétal dans la synthèse de (-)-**9**. Dans la synthèse de fragments de (-)-**9**, les groupes de Sasaki (fragment EFGHI)⁹⁴, Forsyth (fragment FGHI)⁹⁵ et Carter (fragment FGHI)⁹⁶ ont utilisé des stratégies similaires. Ces derniers ont initié la synthèse de ce fragment par génération initiale du spiroaminocétal en premier. Ce noyau hétérocyclique a été obtenu par la réaction d'une amine pauvre en électron et un cétal, médié par un acide de Lewis. Par exemple, dans les travaux de *Sasaki et al.*, les auteurs ont préparé le synthon **14** (Schéma 8), puis ce dernier a été soumis à différentes conditions (acide de Lewis, solvant,

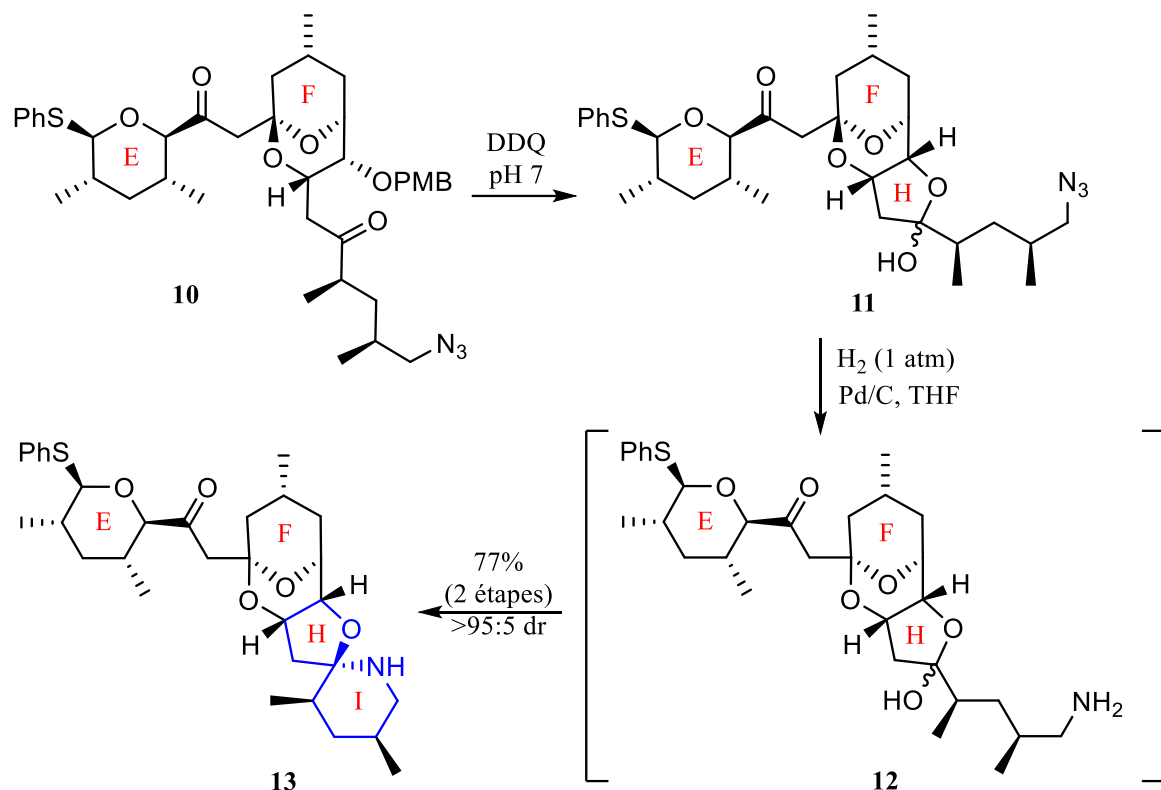


Schéma 7

température). Les auteurs ont conclu qu'en soumettant **14** à des acides de Lewis à basse température, utilisant une amine sous forme de sulfonamide (nosyle) et en ayant un tétrahydrofurane peu encombré sous forme d'alcool libre, seul le diastéréoisomère non-naturel **16** était obtenu. Ils ont remédié à ce problème par la synthèse d'un précurseur de cyclisation semblable **15**, mais en préparant l'amine sous forme de carbamate de *n*-propyle et du noyau tétrahydrofurane encombré en fonctionnalisant l'alcool avec un groupement benzyl. Dans ce cas, l'isomère naturel **17** de l'azaspiracide a été obtenu avec 78% de rendement et un excellent contrôle diastéréomérique.

Il a été généralement conclu par ces auteurs que la diastéréosélectivité était largement contrôlée par la nature du substrat, par l'exemple du groupe d'Evans, qui n'ont obtenu que le diastéréoisomère désiré sans mélange. Le groupe de Carter a aussi démontré ce diastéréocontrôle en début de synthèse en altérant les groupements fonctionnels du précurseur de cyclisation afin d'obtenir le diastéréoisomère voulu **17**.⁹⁶

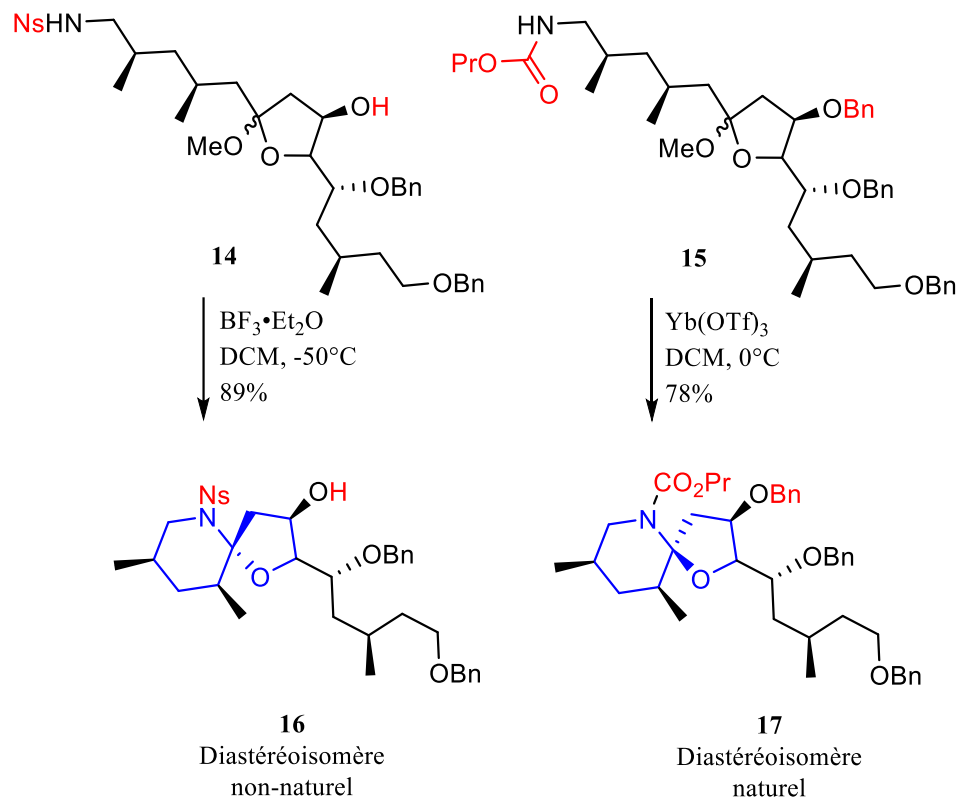


Schéma 8

I.3.3.3. Marineosine A

La marineosine A **18** est un alcaloïde macrocyclique marin comportant le motif spiroaminocétal et a été isolée en 2008 chez des actinomycètes du genre *Streptomyces* par Fenical *et al.*⁹⁷ Marineosine A a démontré une excellente inhibition de la croissance de cellules de carcinome du côlon humain (HTC-116, $\text{IC}_{50} = 0.5 \mu\text{M}$) et a depuis été une cible de synthèse convoitée en raison de son activité biologique et sa structure moléculaire complexe.⁹⁷

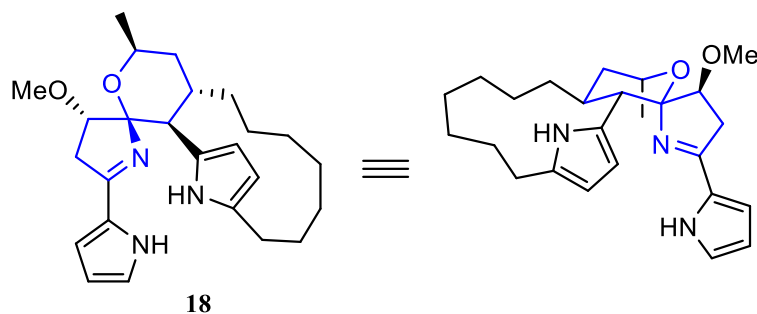


Figure 16. Structures 2D et 3D de la marineosine A

Sa synthèse totale a été complétée et sa structure révisée par le groupe de Harran en 2019.⁹⁸ Plusieurs synthèses du cœur spiroaminocétal de cette molécule ont été publiées en employant des techniques de cyclisation médiées par des acides^{99, 100, 101} comme discuté antérieurement, mais une méthodologie peu commune, une cyclisation en cascade catalysée par Au(I), a été utilisée pour générer le spiroaminocétal par *Sarli et al.*¹⁰² Similairement, cette méthodologie de cyclisation en cascade sur alcyne a aussi été appliquée dans la synthèse d'un stéroïde hexacyclique spirocyclique possédant un haut degré de similarité avec la tomatidine, l'hippuristanol¹⁰³ (**Schéma 9**). Ce dernier est à été synthétisé par l'équipe du Professeur Pierre Deslongchamps en 2014. En exposant l'alcyne **19** à Hg(II) brièvement, le spirocétal **20** précurseur de l'hippuristanol **21** est obtenu avec un excellent rendement. La stratégie est comparable mais elle utilise Hg(II) pour le spirocétal versus Ag(I) pour le spiroaminocétal de la marineosin A **18**.

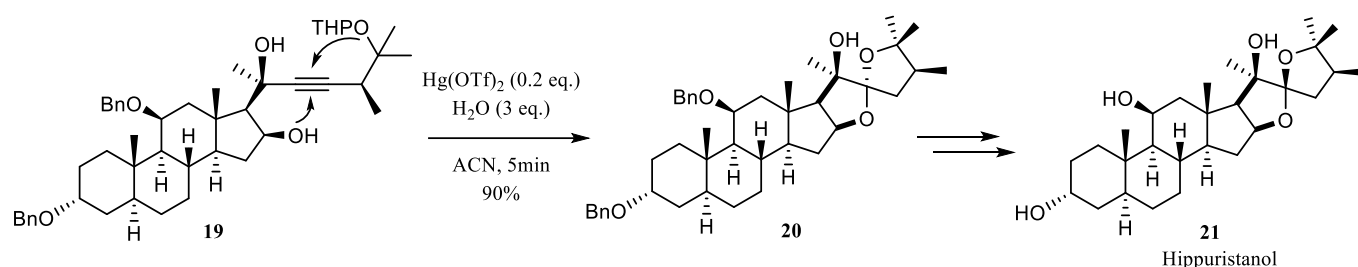


Schéma 9

Dans le cas de la synthèse du cœur spiroaminocétal de la marineosine A, les auteurs ont utilisé 0.05 équivalents d'un système bicatalytique Au(I)/Ag(I) pour effectuer la cyclisation en cascade (**Schéma 10**). La construction du fragment **22**, désiré pour la cyclisation, a été complétée mais l'exométhylène de ce dernier s'est isomérisé en un mélange d'énynes *E/Z* **23** de manière non contrôlée pendant sa purification. Les auteurs ont décidé de continuer la séquence avec ces impuretés présentes dans l'énynne désiré **22**. Ceci a donc mené à des produits non désirés lors de la cyclisation (**25** et **26**), ainsi que le produit désiré **24**, en 49% de rendement total, dont 16% de ce rendement était le produit de cyclisation indésirés. Cette méthodologie a donc démontré que la construction du motif oxazaspiro[4.5]décane de la marineosine A était possible, outre les impuretés présentes dans le réactif précurseur de la cyclisation en cascade.

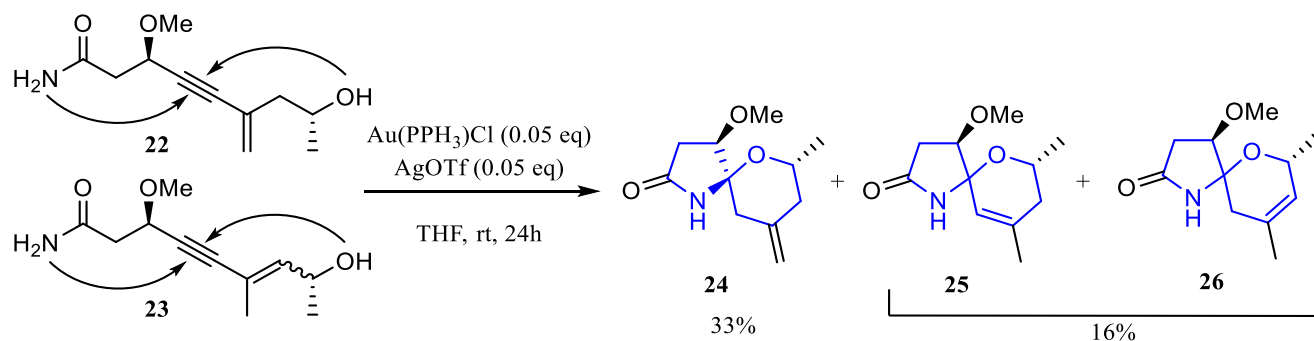


Schéma 10

I.3.3.4. Solasodine

La solasodine **27**, le dérivé aglycone de la solamargine **28** (Figure 17), est un glycoalcaloïde de la famille des *Solanaceae*, présent dans au moins 100 espèces du genre *Solanum*.¹⁰⁴ La solasodine est le diastéréoisomère de la tomatidine (**1**). Les deux molécules diffèrent seulement dans leur stéréochimie aux carbones 22 et 25 (**27** = 22*R*, 25*R* et **1** = 22*S*, 25*S*). La solamargine s'est montrée être une cible synthétique intéressante par exemple, grâce à son activité anticancéreuse sur les cellules de l'hépatome humain (IC_{50} : 3.7 $\mu\text{g/mL}$, Hep3B)¹⁰⁵ et sur des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines

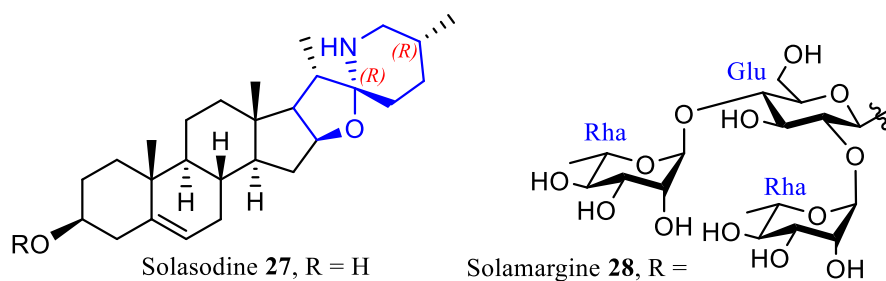


Figure 17. Structures de la solasodine et solamargine

(IC_{50} : 3 μM , H441).¹⁰⁶ La synthèse de la partie stéroïdienne de **27** a été rapportée plusieurs fois depuis sa découverte^{107,108,109} mais la synthèse la plus efficace a été rapportée avec un excellent rendement global de 50% sur 3 étapes par Tian *et al.* en 2015 à partir de l'acétate de diosgénine **30** (Schéma 11). **30** a été préparé via la diosgénine **29**, un phytostéroïde peu coûteux et disponible commercialement. L'anneau F de **30** a été facilement ouvert en utilisant un électrophile fort ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) et un nucléophile faible (LiBr). Ceci a généré le ω -bromo énon **31**, qui n'a pas été isolé mais seulement récupéré par parachèvement. Ce dernier a ensuite été dissous dans le DMF et a subi une substitution de type $\text{S}_{\text{N}}2$ par

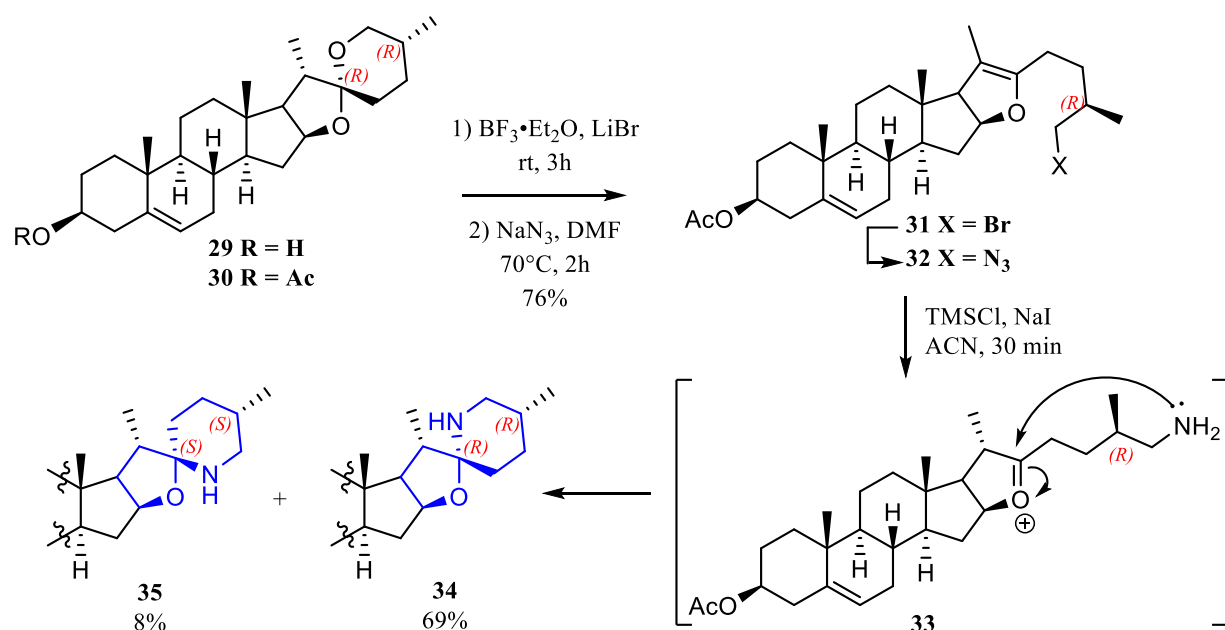


Schéma 11

l'azoture de sodium afin d'obtenir le ω -azido énon **32** avec un rendement de 76%. Ceci a, en une étape, permis d'ouvrir le cycle F et substituer l'oxygène par un atome d'azote. La fermeture du cycle F a ensuite été effectuée par le TMSI, un réactif connu pour être un réducteur d'azoture en conditions douces¹¹⁰ et qui crée, dans l'acétonitrile, un milieu faiblement acide capable de protoner l'éther d'énon **32**. L'amine subséquente a donc cyclisé sur l'oxonium **33** afin de créer le spiroaminocétal désiré, l'acétate de solasodine **34** (69%) et l'acétate de tomatidenol **35** (8%) comme sous-produit. Il a été proposé par les auteurs que l'obtention non désirée de **35** a été la conséquence d'une tautomérisation *in situ* imine-énamine (**Schéma 12**) de **33** avant la fermeture de cycle, qui a formellement inversé le centre asymétrique ($25R \rightarrow 25S$) en position 25. Ce sous-produit, contenant maintenant un méthyle *S*, aurait cyclisé afin d'obtenir une chaise avec un méthyle en position équatoriale au cycle F et donc donner le spiroaminocétal ($22S,25S$)-**35**.

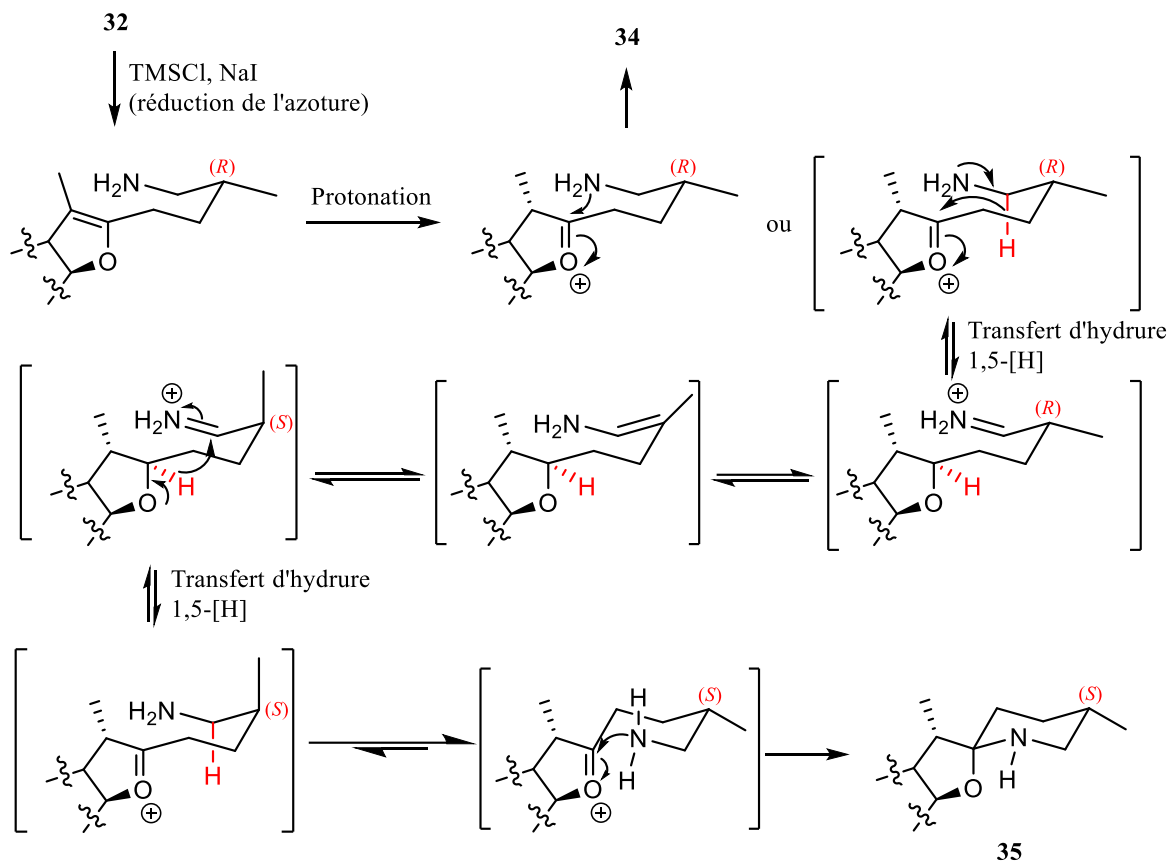


Schéma 12

1.3.3.5. Hydantocidine

L'hydantocidine **36** (**Figure 18**), un membre de la famille des hydantoïnes, est un spironucléoside, analogue de nucléoside, où la base azotée et l'unité sucre sont liées sur le même atome de carbone. **36** est un spironucléoside naturel isolé par fermentation de *Streptomyces Hygroscopius*.¹¹¹ Hydantocidine ainsi que ses dérivés de la base azotée¹¹² et du sucre¹¹³ ont largement été étudiés pour leurs activités herbicides.¹¹⁴ Il a aussi été démontré qu'un dérivé de **36**, le spirohydantoïne glucopyranose (**37**), est le plus puissant inhibiteur de l'enzyme glycogen phosphorylase connu ($K_i = 3.1 \mu\text{M}$).¹¹⁵ Cette enzyme pourrait jouer un rôle important dans le traitement du diabète.¹¹⁶ Ernesto Suárez et son groupe ont développé une méthodologie puissante pour arriver au cœur 1-oxa-6-azaspiro[4.4]nonane de **36** par «fonctionnalisation lointaine», utilisant des conditions similaires à la réaction de Hofmann-Löffler-Freytag (HLF). Leurs travaux se sont concentrés sur la cyclisation de radicaux d'azote des dérivés

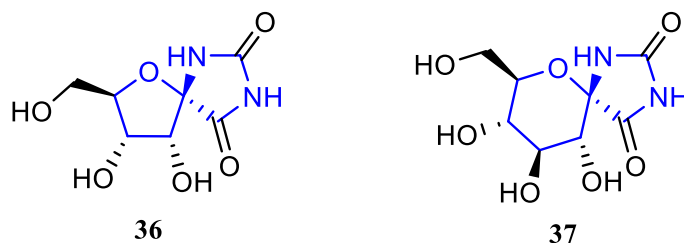
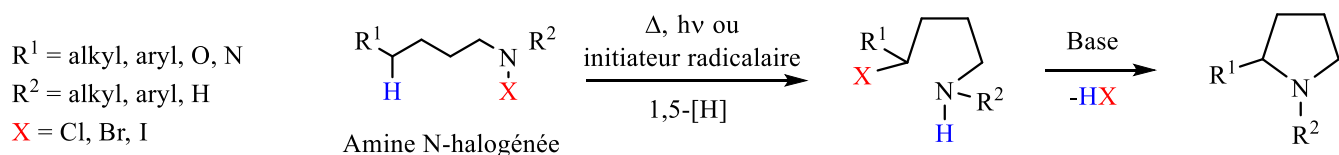


Figure 18. Structure de l'hydantocidine **36** et spirohydantoïne **37**

aminés de sucres afin d'arriver aux spiroaminocétals désirés. La réaction de *HLF* est la formation d'amines cycliques via une amine *N*-halogénée par un transfert intramoléculaire 1,5-[H] à un radical azote (**Schéma 13**).¹¹⁷ La *modification Suárez* de la réaction *HLF* permet d'éviter l'utilisation d'amine *N*-halogénée en utilisant des amines appauvries en électrons tel que *N*-nitroamides¹¹⁸, *N*-cyanamides¹¹⁹ et *N*-phosphoramidates¹²⁰ et amides¹²¹, qui réagissent avec un iode hypervalent en présence d'iode moléculaire. *Suarez et al.* ont donc appliqué cette méthodologie à la synthèse des spiroaminocétals. Des dérivés aminés de sucres ont donc été préparés à partir de D-Glucose et de furanose. Avec des sucres

Réaction Hoffmann-Löffler-Freytag



Modification de Suarez

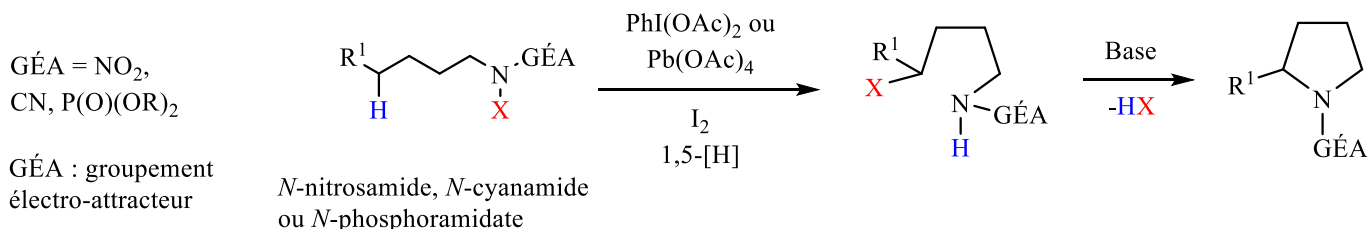


Schéma 13

ayant tous leurs alcools protégés, les auteurs ont soumis des dérivées *N*-phosphoramidates aux conditions d'abstraction d'hydrogène moléculaire. Les conclusions tirées par les auteurs sont démontrées au **Schéma 14**. La nature de l'unité sucre a eu une influence sur la diastéréosélectivité de la formation du spiroaminocétal, et de meilleurs rendements ont été observés lors de la formation des

noyaux 1-oxa-6-azaspiro[4.4]nonane (**40**) versus les noyaux les 1-oxa-6-azaspiro[4.5]décane (**41**). Les auteurs ont raisonné que la diastéréosélectivité observée de la formation de **40** et **41** serait due à l'encombrement stérique sur la face β de la molécule. L'utilisation de substrats portant d'autres unités de sucres a mené à des diastéréosélectivités allant de 3:1 à 2:1.¹²⁰ L'utilisation d'amides (**42**) a aussi donné des spirocycles désirés (**43**) avec de bon rendements et donnant un seul diastéréoisomère.

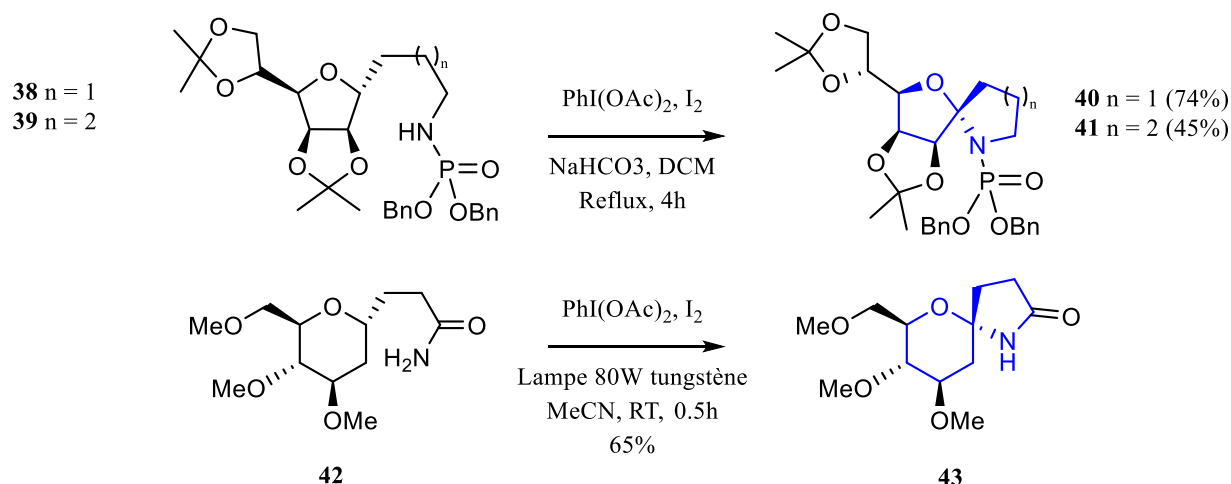


Schéma 14

I.4. Analyses rétrosynthétiques et objectifs de cette synthèse.

La valorisation de la tomatidine en tant qu'agent antibiotique requiert de grandes quantités de cette dernière, soit pour l'utiliser telle quelle, soit pour en faire des dérivés. Son prix, qui varie entre 700 et 2,000\$ le gramme, rend son exploitation à partir de sources commerciales (qui proviennent d'extraits de plantes) difficile voire non viable dans nos projets de développement d'antibiotiques. De plus, sa pureté à partir de sources commerciales varie entre 85 et 95%. Par conséquent, nous nous sommes tournés vers la synthèse chimique pour assurer un approvisionnement en quantité et qualité voulues.

Nous avons donc initié nos efforts vers la tomatidine en se basant sur les travaux de la littérature décrits ci-dessus. Certaines synthèses se sont avérées être plus viables pour atteindre nos objectifs, et ont été attaquées par ordre de faisabilité globale (nombre d'étapes, difficulté, rendements théoriques). Ultimement, le but de ces travaux a été de trouver une voie synthétique accessible en peu d'étapes, utilisant des matériaux peu coûteux afin d'effectuer cette synthèse à grande échelle. Certes, plusieurs synthèses de la solasodine **27**, très similaire à notre cible de synthèse, ont été publiées en ayant notre molécule cible comme sous-produit (Schéma 11), mais aucune synthèse diastéréosélective de la

tomatidine n'a été publiée auparavant dans la littérature. Dans le cadre du développement et de l'optimisation de cette molécule contre les variants à petites colonies de *S. aureus* et autres bactéries, une synthèse applicable à grande échelle ouvrirait la porte à beaucoup de matériel de départ, qui est très cher à l'achat. La tomatidine a donc été analysée rétrosynthétiquement. La génération diastéréosélective du centre spiroaminocétal de la tomatidine a semblé être l'étape la plus difficile de cette synthèse, donc les analyses rétrosynthétique seront centrées sur cette fonction. En effet, les cycles A-D de la tomatidine se retrouvent dans plusieurs stéroïdes naturels disponibles en grande quantité et elle serait donc disponible à partir de produits naturels peu dispendieux. Nous avons donc opté pour une hémisynthèse.

La voie la plus prometteuse selon nous restait la cyclisation vue dans la synthèse de l'azaspiracide 1 (**9**). L'analyse rétrosynthétique conséquente au **Schéma 15** a donc été proposée. La tomatidine **1** pourrait être formée via la cyclisation de l'amine obtenue par réduction de l'azoture **44**. L'hémicétal de **44** pourrait être formé par déprotection du cétal/thiocétal **45**, précédemment transformé via substitution du diol **46**. Ce diol contenant une cétone protégée pourrait provenir de la forme ouverte céto-diol **47** du spirocétal **48**, un phytostéroïde commercial.

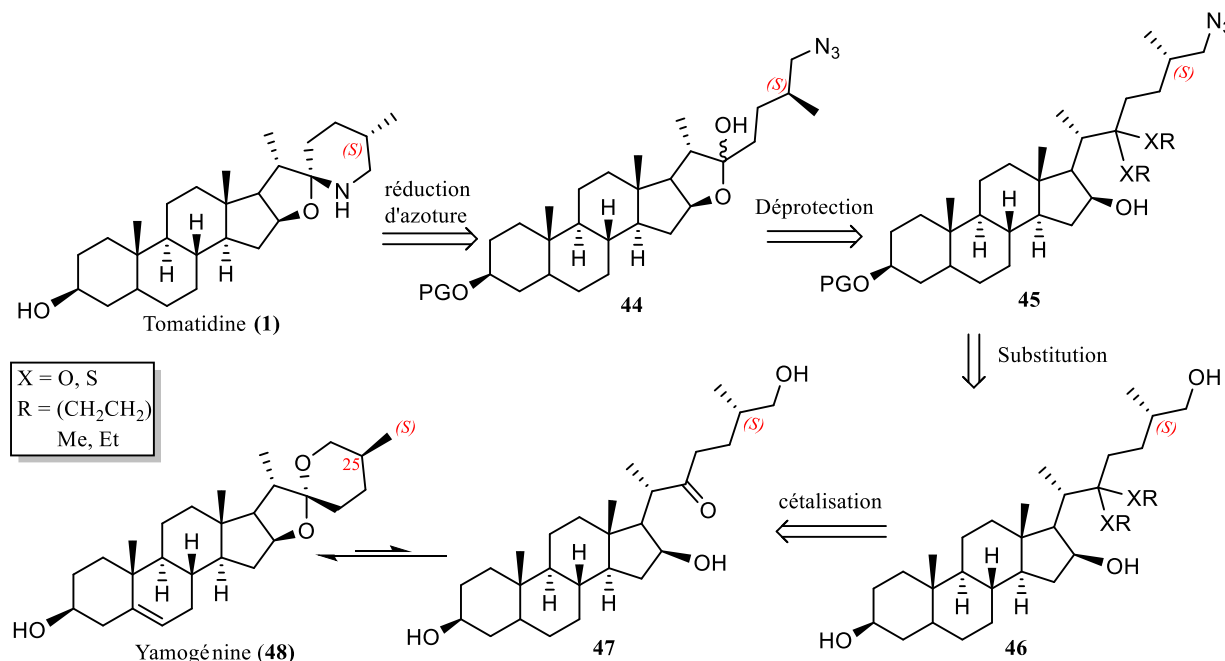


Schéma 15

Le phytostéroïde commercial yamogénine (**48**) est environ 25 à 50 fois moins coûteux que la tomatidine (~40 \$/g) et nous avons souhaité l'exploiter dans cette synthèse, car il possédait tous les bons centres asymétriques requis aux cycles A-E, et aussi l'asymétrie requise de l'alcaloïde désiré en position 25 (25*S*). Dans le but d'exploiter **48**, une autre conclusion simple à laquelle nous sommes arrivés serait d'appliquer directement la méthodologie de la synthèse de la solasodine à notre substrat de choix, la yamogénine. La stratégie serait basée sur la stratégie de synthèse de la solasodine **27** (Schéma 11) en utilisant le phytostéroïde commercial **48**, protégé en position 3 et de le soumettre aux conditions prescrites par *Tian et al.* (Schéma 16) afin d'obtenir l'ouverture cycle F et de substituer l'éther d'énol ω-halogéné subséquent par un azoture. Le composé **49** résultant subirait une réduction d'azoture afin de d'obtenir la tomatidine **1**. Comme il a été observé dans la synthèse de **27** (Schéma 11), peu d'isomérisation était à prévoir avec cette stratégie.

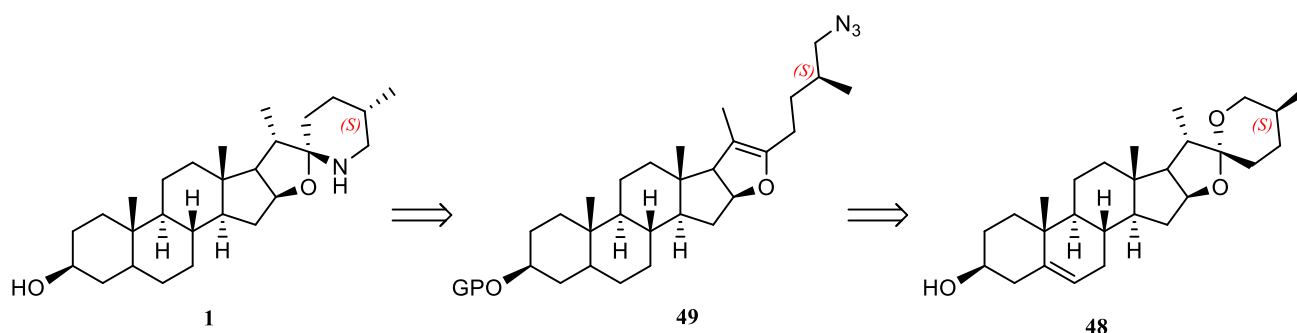


Schéma 16

Une autre analyse rétrosynthétique proposée pour la synthèse de la tomatidine utiliserait la stratégie de condensation de sulfonamide/carbamate sur un oxonium, généré par l'activation acide d'un hémicétal / cétal, démontré au Schéma 17. Cette stratégie a été conçue en se basant sur les synthèses de la pandamarilactone **3** et fragments de l'azaspiracide-1 **9** (Sasaki, Forsyth et Carter). Un précurseur stéroïdien intéressant de l'hémicétal/cétal **50**, la lactone dinorcholanique **52**, a précédemment été rapportée dans la littérature. Ce dérivé stéroïdien a été vu comme un candidat idéal pour la formation d'un hémicétal précurseur à la cyclisation, en plus de nous donner l'opportunité d'ajouter une panoplie de nucléophiles sur la fonction ester. La dérivatisation de la lactone **52** imagée a été pensée par addition d'un Grignard fabriqué à partir du fragment asymétrique halogéné **53**, originant du petit alcool chiral **54**. Évidemment, il est difficile voir impossible de générer un réactif de Grignard sur une molécule contenant une fonction azoture ou une amine protégée (souvent sous forme de carbamate ou amide). Suite à une étape de protection, nous avons donc pensé effectuer l'addition organométallique

sur la lactone **52** à l'aide d'un réactif contenant un atome d'oxygène protégé afin d'obtenir **51**, puis substituer ce dernier par un groupement azoté afin d'obtenir **50**.

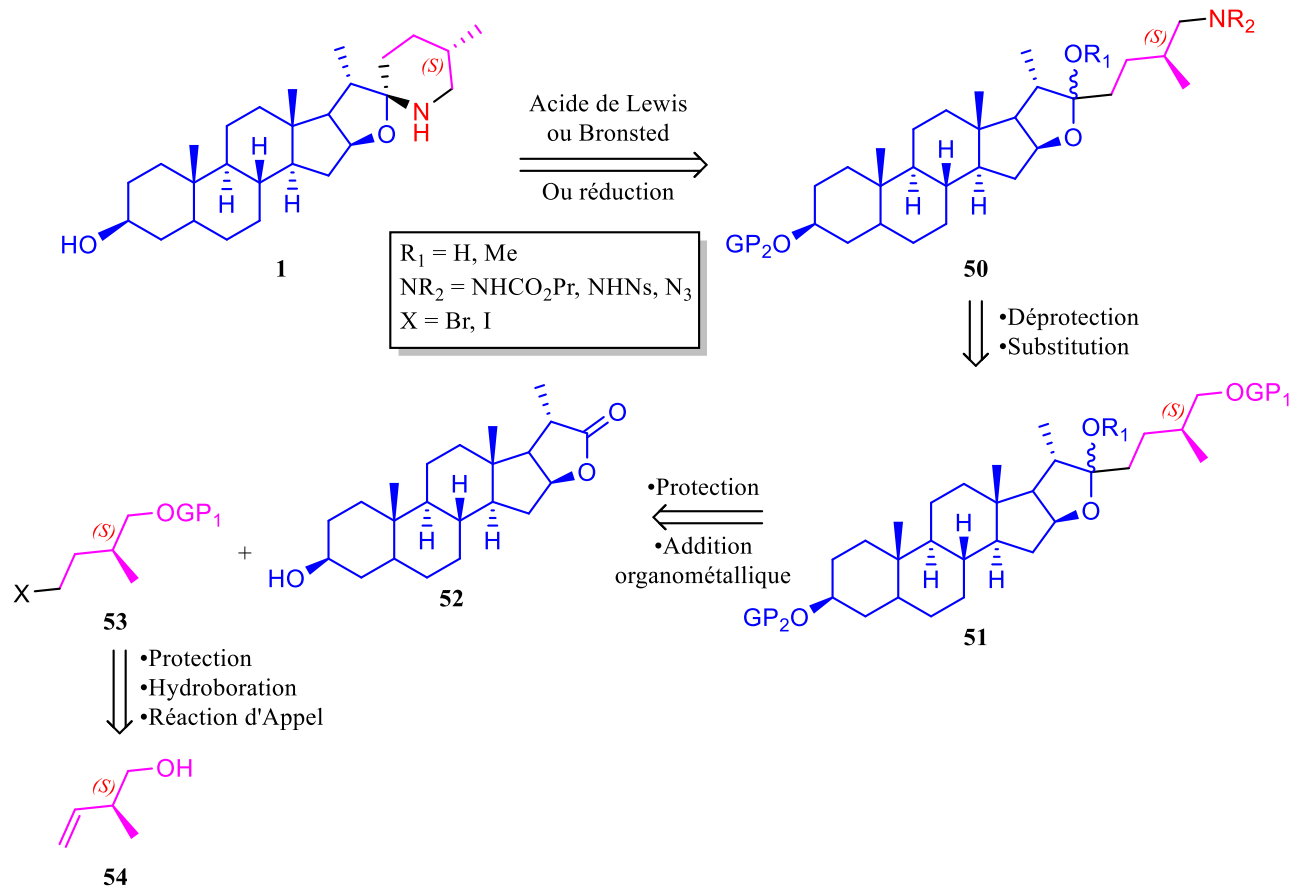


Schéma 17

CHAPITRE 1. EFFORTS VERS LA SYNTHÈSE DE LA TOMATIDINE

1.1. Analyse rétrosynthétique 1 : Piégeage de la cétone du spirocétal de la yamogénine

Les premières tentatives de cette synthèse se sont centrées sur la forme ouverte céto-diol du spirocétal yamogénine. En effet, nous avons pensé que le spirocétal **55** était la forme thermodynamiquement favorisée de la forme céto-diol **56**, et qu'en utilisant un très gros excès d'éthylène glycol (**Schéma 18**), il serait possible de piéger cette cétone sous forme de cétal, nous permettant de fonctionnaliser séquentiellement les deux alcools libres. La yamogénine **48**, acquise chez Toronto Research Chemicals, a été successivement hydrogénée catalytiquement sous 40 psi d'hydrogène, et traitée par la pyridine en présence d'anhydride acétique afin de générer le spirocétal désiré **55**, prêt pour nos tests. Nous avons utilisé plusieurs diols/dithiols différents afin d'obtenir le cétal **57**.

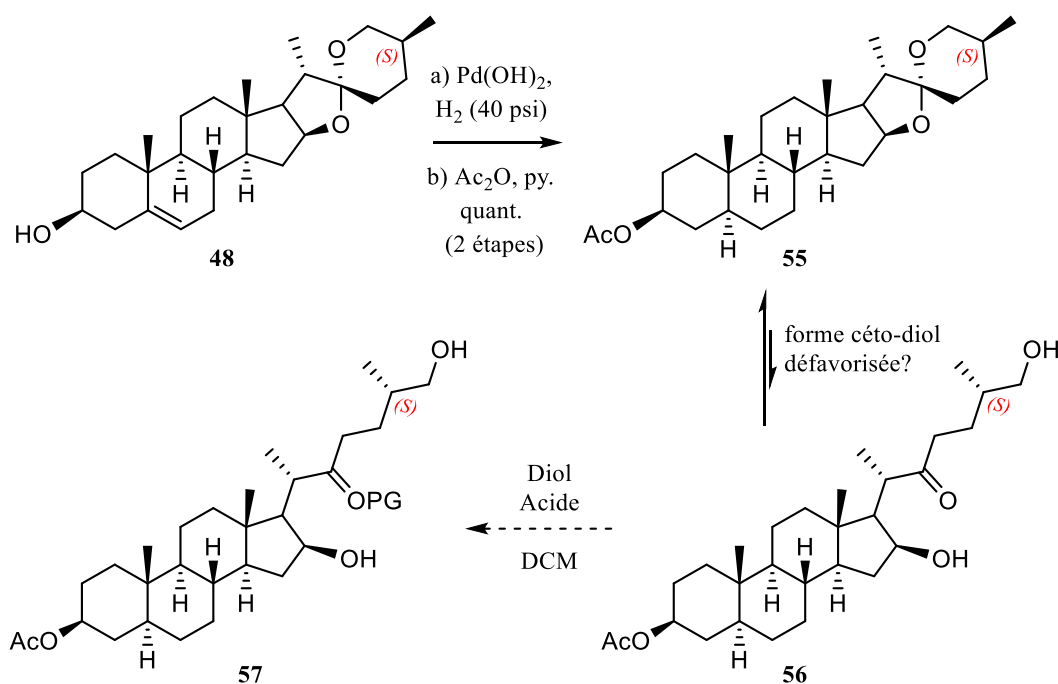
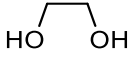
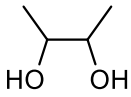
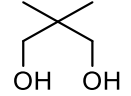
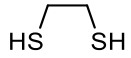
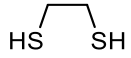
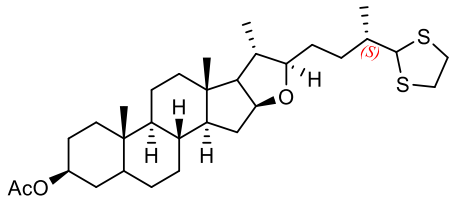
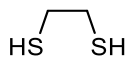
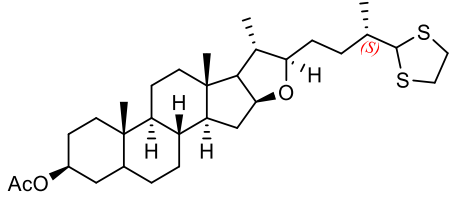


Schéma 18

Plusieurs essais ont mené à la conclusion que cet équilibre spirocétal – céto-diol était très déplacé vers la forme fermée. En utilisant plusieurs diols et acides différents, il a été impossible d'arriver au cétal désiré **57**. Il a été conclu que cet équilibre était quasi non-existant. La même conclusion a été tirée en utilisant des dithiols. Après avoir échoué avec le 1,2-diol (**Tableau 1**, entrées 1) et toute la série diastéréomérique des butane-2,3-diols (entrée 2), le 2,2-diméthylpropan-1,3-diol (entrée 3) a été testé

aussi afin d'exploiter l'effet *Thorpe-Ingold* par compression d'angle, connu pour accélérer les réactions de cyclisation¹²², mais en vain. L'éthane-1,2-dithiol (entrée 4) a aussi échoué à la capture de la cétone de **56** lorsqu'utilisé avec un acide de Brönsted. Lorsqu'utilisé avec des acides de Lewis (entrée 5 et 6), l'éthane-1,2-dithiol ont produit des dérivés inattendus (**Tableau 1**). En effet, nous avons constaté que le produit de départ était entièrement transformé par CCM et que les déplacements chimiques attendus

Tableau 1. Conditions testées du piégeage du céto diol **56**

Entrée ^a	Diol ^b	Acide (eq.)	Produit	Rendement
1		<i>p</i> TsOH (0.1)	Aucune réaction	-
2 ^c		<i>p</i> TsOH (0.1)	Aucune réaction	-
3		<i>p</i> TsOH (0.1)	Aucune réaction	-
4		<i>p</i> TsOH (0.1)	Aucune réaction	-
5		Zn(OTf) ₂ (2.00)		72%
6		BF ₃ •Et ₂ O (2.00)		59%

a) Toutes les réactions ont été effectuées au reflux du DCM pendant 3 heures. b) 10 équivalents. c) les trois diastéréoisomères du diol ont été testés

étaient présents par RMN, mais des études RMN 2D ont confirmé que le cycle F est ouvert et que le carbone 22 est réduit et le carbone 26 oxydé. Après nous être penchés plus sur cette transformation et avoir cherché plus en profondeur, nous avons trouvé deux publications arrivant à la même conclusion, toutefois ayant omis un mécanisme pour cette transformation.^{123,124} Un mécanisme hypothétique de transformation de **55** vers le produit inattendu **60** a donc été proposé au **Schéma 19**. Après

complexation de l'oxygène du cycle F par l'acide de Lewis, l'ouverture du cycle F assistée par l'oxygène du cycle E de **55** donne le complexe **58**. Cette étape est suivie d'une migration 1,5-[H], neutralisant l'oxonium au cycle E et donnant l'oxonium complexé **59**, qui subit ensuite une thiocétalisation par l'éthanedithiol afin de fournir le thiocétal **60**. À la lumière de ces résultats, il a été conclu que le problème devait être attaqué sous un autre angle. Malgré cet échec, il a été découvert que l'anneau F de **55** pouvait être ouvert et fonctionnalisé et les efforts futurs se sont centrés sur cette fonctionnalisation.

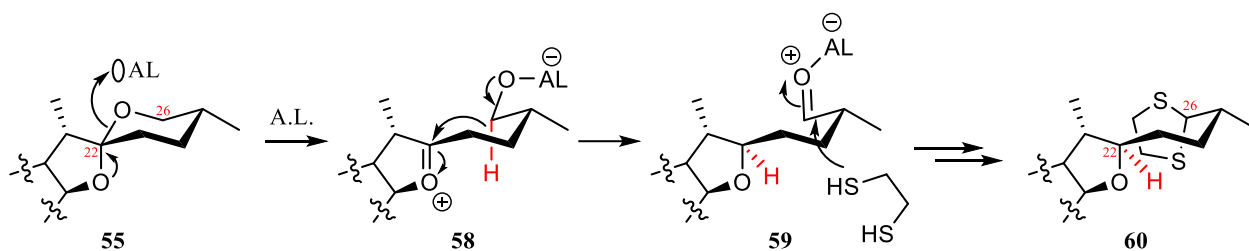


Schéma 19

1.2. Analyse rétrosynthétique 2 : ouverture et fonctionnalisation de l'anneau F de la yamogénine

Comme observé dans la synthèse de la solasodine par le groupe de Tian (Schéma 11), nous avons tenté d'appliquer cette stratégie au substrat contenant la stéréochimie requise (25*S*) de notre cible, c'est-à-dire la yamogénine **48**. Le substrat transformé **55** a donc été soumis aux mêmes conditions. L'azoture, en une seule étape, a été obtenu avec un excellent rendement de 96% après purification, ce qui était une nette amélioration par rapport au rendement de 76% rapporté. Les différences entre les substrats sont illustrées au Schéma 20.¹⁰⁷

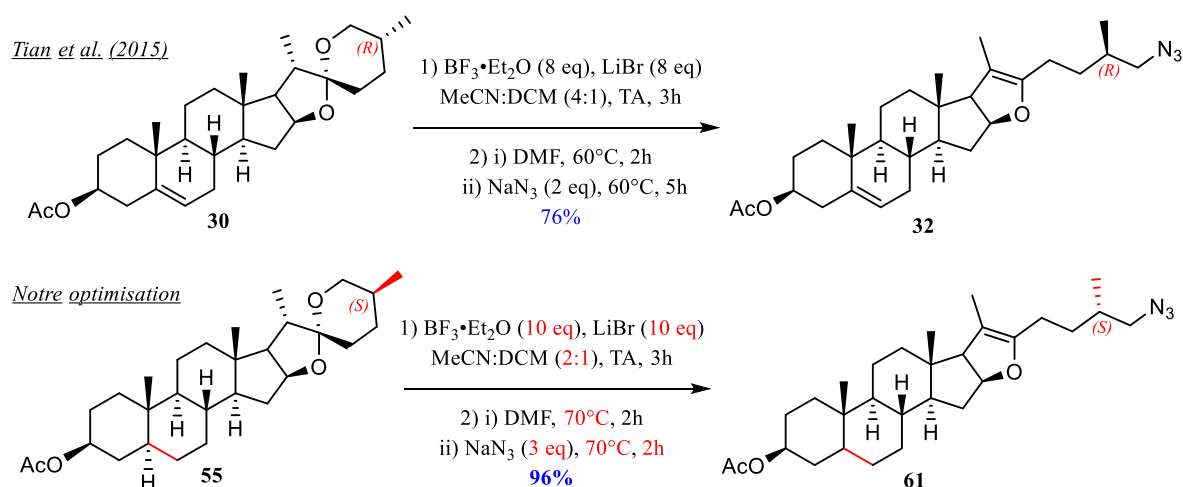


Schéma 20

Le précurseur désiré **61**, maintenant disponible, a donc été soumis aux conditions réductrices exploitées par *Tian et al.* Les essais de réduction de l'azoture de **61** au TMSI ont mené à des résultats décevants. L'acétate de tomatidine **35** désiré était obtenu, mais avec un rendement inférieur à celui de l'acétate de

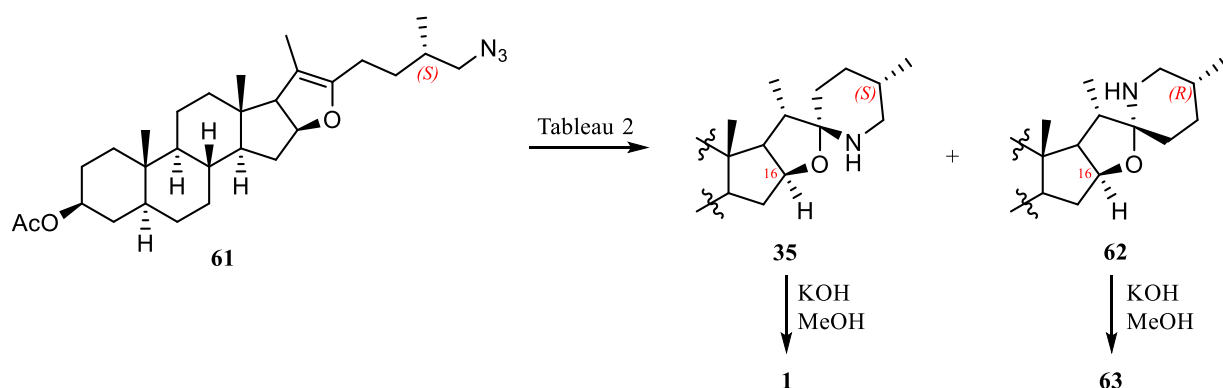


Schéma 21

dihydrosolasodine **62**. Après hydrolyse de l'ester en position 3, il a été possible de séparer les deux diastéréoisomères subséquents, la tomatidine **1** et la dihydrosolasodine **63** par chromatographie éclair. Nous avons donc isolé ces deux espèces et avons généré des cristaux par cristallisation à évaporation lente d'un mélange 1 : 3 DCM/MeOH dans un enceinte à 100% MeOH. Ces cristaux ont ensuite été analysés par diffraction des rayons X (**Figure 19**).

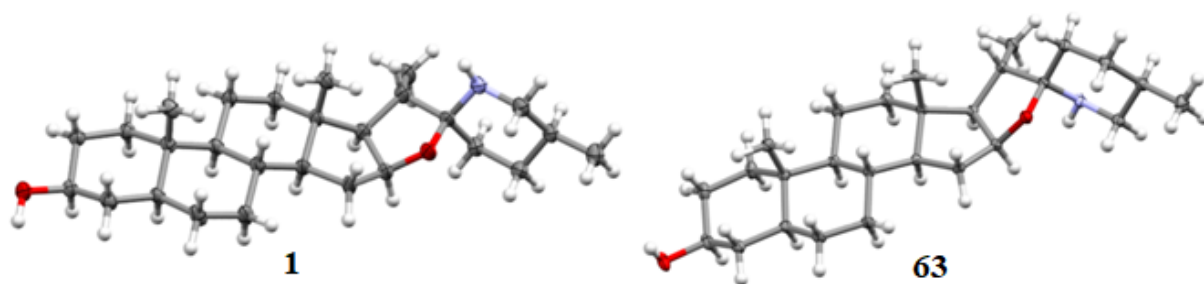


Figure 19. Diagrammes ORTEP de la tomatidine **1** et de la dihydrosolasodine **63**

Un résumé des essais d'optimisation de cette réaction est rapporté au **Tableau 2**. La détermination du ratio **35** : **62** a été effectuée par RMN ^1H des produits bruts réaction, où le déplacement chimique du proton en position 16 est unique à chacun des isomères. Initialement, notre premier réflexe a été de faire varier la température de la réaction. Les essais au reflux d'ACN (80 °C) et à 0 °C ont mené à des ratios

similaires (entrées 1 à 3). Nous avons tenté de limiter cette isomérisation imine-énamine le plus possible en abaissant la température de réaction. Or, lorsque la température est abaissée à 0°C ou en-dessous (**Tableau 2**, entrées 2 et 4), l'iodure de sodium précipite et la génération de TMSI *in situ* devient impossible. Nous avons donc pensé ajouter le TMSI directement dans la solution contenant **61**.

Tableau 2. Essais d'optimisation de la réduction de l'azoture **61**.

Entrée	Conditions ^a	Solvant	Température	Ratio 35 : 62 ^{c,d}
1	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	ACN	TA	28 : 72
2	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	ACN	0°C	29 : 71 ^b
3	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	ACN	80°C	32 : 68
4	TMSI (2.1 eq)	ACN	0°C	27 : 73
5	TMSI (2.1 eq)	ACN	-40°C	14 : 86
6	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	Acétone	TA	26 : 74
7	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	THF	TA	28 : 72
8	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	Dioxane	TA	Aucune conversion
9	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	EtOH	TA	28 : 72
10	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	CHCl ₃	TA	32 : 68
11	TMSCl (2.1 eq), NaI (2.2 eq)	DMF	TA	30 : 70

a) L'ajout de TMSCl au NaI en solution génère TMSI *in situ*. b) Conversion incomplète car NaI insoluble à 0°C. c) déterminé par analyse RMN du brut de réaction. d) Conversion complète après 30 minutes

Le TMSI est disponible commercialement sous forme de liquide fumant hygroscopique difficile à manipuler hors d'une boîte à gants. Des essais ont donc été effectués à 0°C et -40°C (**Tableau 2**, entrées 4-5), pour contourner le problème de solubilité. Malheureusement, le ratio de produit final est resté inchangé, sinon a augmenté en proportion de produit non-désiré. Le changement de solvant n'a aussi apporté aucun changement majeur au ratio des produits. Nous avons proposé que peut-être que dans ces conditions de réaction acides, le produit désiré **35** s'isomérisait en **62**. Une analyse par spectroscopie RMN de la réaction en continu sur des aliquots prélevés du milieu réactionnel à différent temps (10s, 1 min, 3min, 10min, 30 min) a conclu que le produit **35** était formé à la même vitesse que **62**, pointant vers une absence d'isomérisation des produits dans les conditions réactionnelles. Sachant donc que l'amine générée était l'espèce réactive et que l'addition de TMSCl à cette amine a aussi

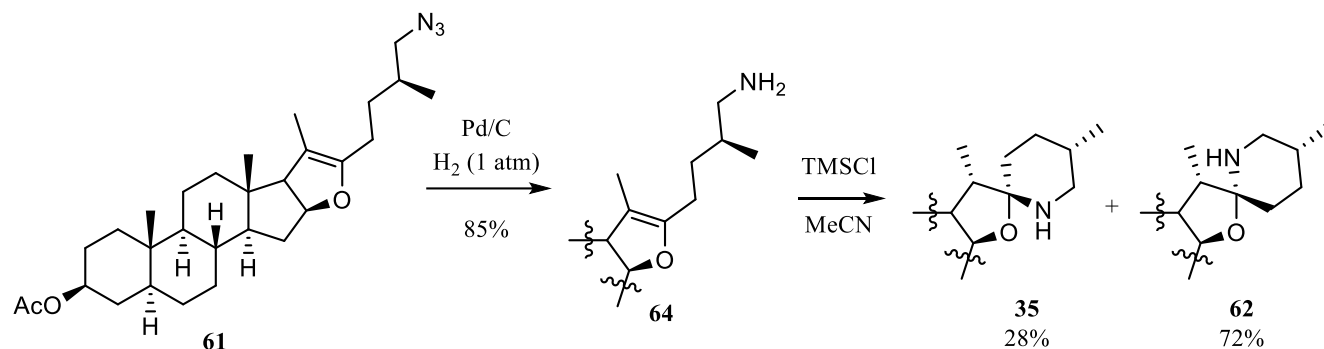


Schéma 22

donné la fonction spiroaminocétale désirée (Schéma 22), nous avons tenté de générer le centre spiroaminocétal de cette manière, mais malheureusement le ratio **35** : **62** est resté inchangé. Déçus de ces résultats, nous avons fait quelques pas en arrière et sommes revenus aux structures isolées **1** et **63**. Avec l'aide du P^r Claude Legault, nous avons effectué des analyses computationnelles des conformations de la tomatidine et la solasodine. Il a été possible de démontrer théoriquement qu'un de ces deux isomères, la tomatidine **1**, était thermodynamiquement plus haut en énergie. Si une isomérisation du centre spiroaminocétal était possible, l'isomère plus haut en énergie (**1**, Figure 20) isomériserait vers le spirocétal plus bas en énergie, la dihydrosolasodine **63**.

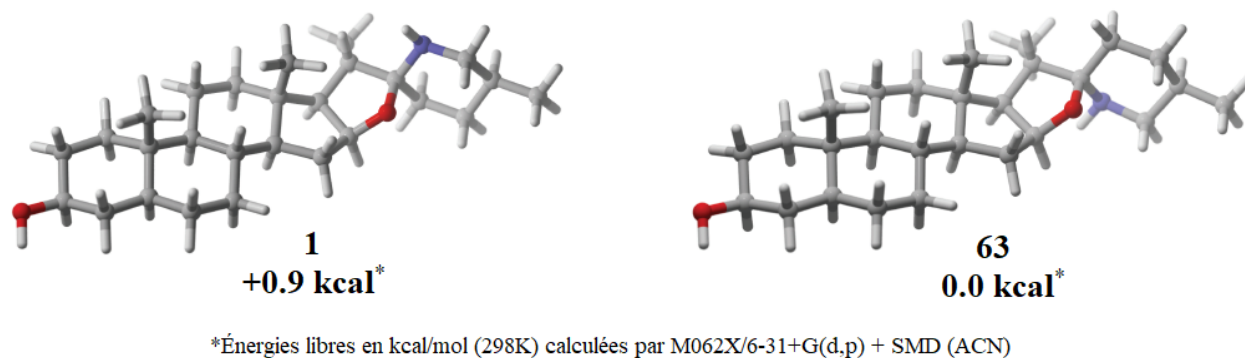


Figure 20. Énergies libres théoriques relatives de la tomatidine **1** et de la dihydrosolasodine **63**

Malheureusement, en soumettant **1** et **63** individuellement à des conditions d'isomérisation (CHCl₃ au reflux en présence d'acides protiques variés), il s'est avéré qu'aucune isomérisation n'a eu lieu avec les deux isomères (Tableau 3). Nous avons pu donc émettre le constat que la fermeture de l'amine sur l'oxonium généré *in situ* s'effectuait de façon irréversible (fermeture cinétique). Par ces essais, il avait

Tableau 3. Tentative d'isomérisation des spiroaminocétals isolés

Entrée	Substrat ^a	Acide	Résultat
1	1	pTsOH (0.15 eq)	Aucune isomérisation
2	1	(+)-CSA (0.15 eq)	Aucune isomérisation
3	1	AcOH (0.20 eq)	Aucune isomérisation
4	63	pTsOH (0.15 eq)	Aucune isomérisation
5	63	(+)-CSA (0.15 eq)	Aucune isomérisation
6	63	AcOH (0.20 eq)	Aucune isomérisation

a) Conditions de réaction : CHCl₃, reflux, 16h, échelle de 15 mg

été espéré qu'au moins une espèce puisse passer par le mécanisme d'isomérisation iminium-énamine décrit au **Schéma 12** mais aucun des substrats purs n'a isomérisé en l'autre. Nous étions donc dans une impasse car le produit désiré n'était jamais obtenu en quantité majoritaire. Ce résultat étant en accord avec les stabilités calculées des produits, un pas en arrière a été fait et nous avons généré des cristaux du produit de départ commercial afin de nous assurer que nous avions le bon produit comportant la stéréochimie 25*S*. La génération de cristaux de la yamogénine commerciale via la même méthode employée pour **1** et **63** a révélé quelque chose de choquant. En effet, l'analyse par diffraction des rayons X de l'échantillon commercial a révélé que la yamogénine (25*S*-**48**) achetée était en fait l'analogue dihydrogéné de la diosgénine (25*R*-**29**), **48-1** (**Figure 21**). Il a été impossible de discerner ces deux diastéréoisomères dans leur subtile différence structurale en RMN ¹H et ¹³C. Ceci n'était visible qu'une fois que l'on avait la solution sous les yeux. Bien que frustrant, ce résultat nous a permis de réconcilier théorie et pratique et expliquer pourquoi les essais de spiroaminocétalisation ont toujours échoué à donner le produit désiré, et que la dihydrosolasodine (25*R*-**63**) a toujours été obtenue en majorité. Bien que ce résultat inattendu (qui a été confirmé par le fournisseur Toronto Research Chemicals) nous ait fait perdre près de 10 mois de travail en ce qui concerne l'atteinte de l'objectif de la synthèse de la tomatidine, ces embûches nous ont tout de même permis de bien mieux comprendre la réactivité du système et de préparer une synthèse de troisième génération encore meilleure.

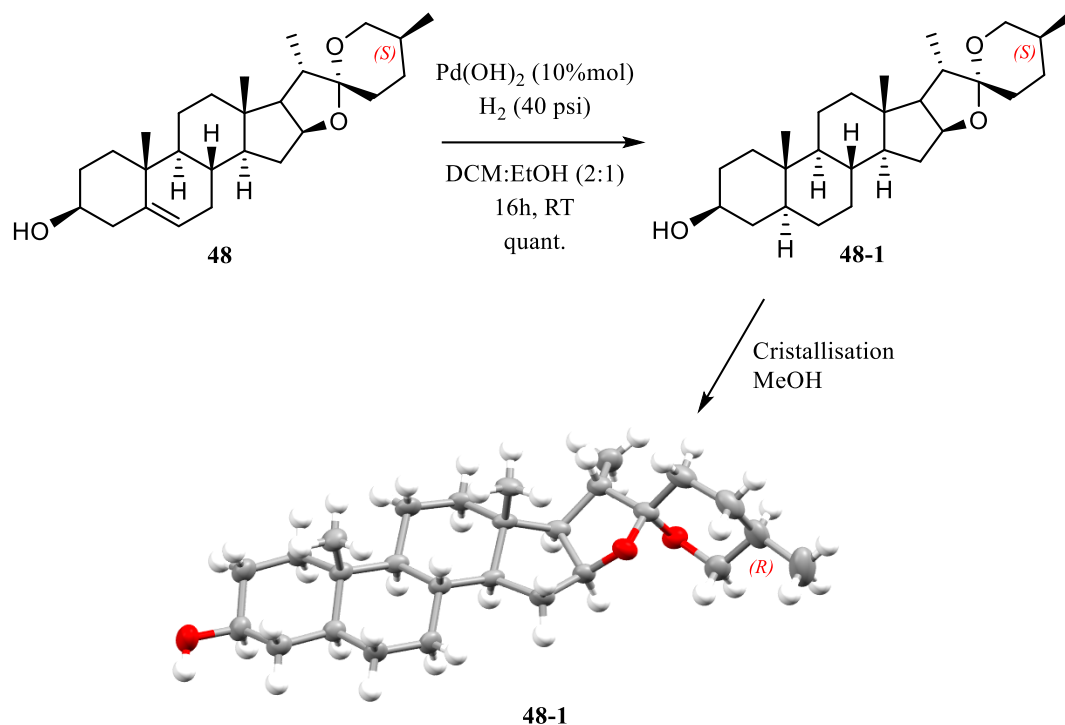


Figure 21. Synthèse et diagramme ORTEP de l'intermédiaire cristallisé **48-1**.

1.3. Analyse rétrosynthétique 3 : Alkylation et fonctionnalisation d'une lactone dinorcholanique

Nos efforts précédents se sont concentrés vers la dérivatisation du phytostéroïde commercial yamogénine. Malheureusement, ce dernier n'était offert que par un seul commerçant, et le produit vendu ne s'est pas avéré être celui annoncé par le vendeur. Un dérivé stéroïdien intéressant pour la construction de la tomatidine a été publié dans la littérature en 2014 par le groupe de Wei-Sheng Tian. Dans ces travaux, la lactone dinorcholanique **52** a été préparée à partir de la tigogénine (dihydrodiosgénine) **65** en une étape, facilement accessible via la diosgénine, et avec 89% de rendement dans la synthèse de la clionamide D illustrée au **Schéma 23**.¹²⁵ La lactone **52** est un candidat de choix pour notre synthèse car cette structure possède tous les bons centres asymétriques, contient cinq des six cycles requis de la tomatidine, et est accessible en grande quantité via un produit naturel peu coûteux. Mais surtout, cette structure a été mise de l'avant dès sa découverte car elle possède un groupement électrophile bien placé permettant de faire entrer un synthon fonctionnalisé par alkylation. La synthèse de la tomatidine a donc été entamée selon notre troisième analyse rétrosynthétique (**Schéma 17**).

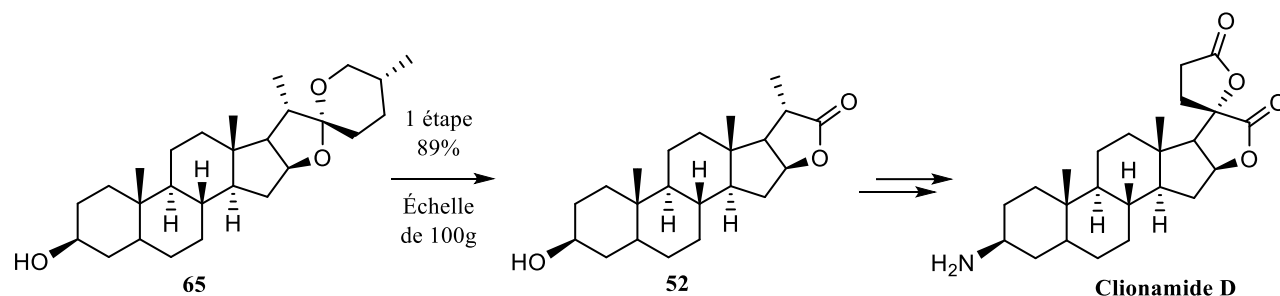


Schéma 23

1.3.1. Génération du synthon asymétrique

Comme démontré au **Schéma 17**, notre analyse rétrosynthétique fait appel à l'alkylation de **52** par le synthon asymétrique **53**. Ce fragment halogéné, qui comporte la stéréochimie de l'anneau F de la tomatidine, n'a jamais été fabriqué dans la littérature jusqu'à présent, mais a été rétrosynthétiquement analysé jusqu'à l'alcool **54**. Cet alcool asymétrique à 5 carbones a été utilisé dans plusieurs synthèses totales et donc plusieurs protocoles d'induction de l'asymétrie étaient disponibles.^{126,127,128,129} Dans ce cas, l'auxiliaire d'Oppolzer, le (+)-camphorsultam **66**, générerait de meilleurs ratios diastéréomériques que l'auxiliaire d'Évans, l'oxazolidinone **67**, généralement plus fréquemment utilisé lors de génération de centre asymétrique (**Figure 22**). Ce dernier a été utilisé pour préparer l'alcool **54** dans un ratio diastéréomérique (d.r.) de 3.6 : 1 seulement¹³⁰, en contraste de l'utilisation de (+)-camphorsultam **66**, qui a mené à des ratios rapportés de >40 : 1 à >50 : 1.¹²⁶

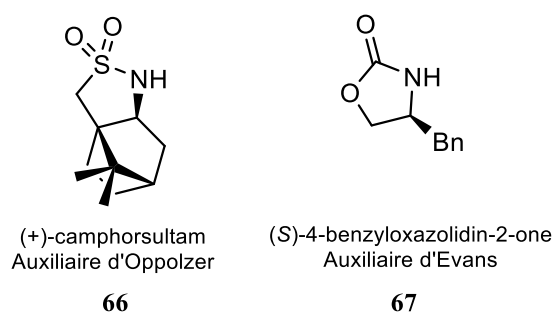


Figure 22. Structure des auxiliaires chiraux utilisés dans la préparation de **54**

Suivant les procédures décrites dans la littérature, nous avons procédé à la crotonoylation du (+)-camphorsultam (5 \$ / g) à l'aide du chlorure de crotonyle dans le toluène (**Schéma 24**), lui-même généré via l'acide *E*-crotonique (0.08 \$ / g) à l'aide du chlorure de thionyle. Le sultam crotonylé **68** a été obtenu avec un excellent rendement de 96% sur échelle de 25 g. **68** a ensuite été déprotoné à l'aide

du LiHMDS dans le THF : HMPA puis alkylé à l'aide de l'iodure de méthyle, donnant l'intermédiaire alkylé **69** avec un rendement de 87% et un ratio diastéréomérique de 98.1 : 1.9 (d.r. > 50 : 1). Le ratio diastéréomérique a été calculé en utilisant le signal ^1H vinylique en β comme sonde (**Schéma 25**). Suite au parachèvement, le brut de réaction a été recrystallisé afin de produire **69** en parfaite pureté diastéréoisomérique (19.2 g, d.r. > 99.9 : 0.1). Le filtrat résultant de cette recrystallisation a ensuite été purifié par chromatographie éclair. Malheureusement, il a été impossible de séparer les 2 diastéréoisomères de cette façon, alors le mélange des deux a donc pu être isolé, donnant 3.30 g d'un mélange, qui contenait 87% du diastéréomère désiré **69** et 13% du diastéréoisomère indésiré (d.r. : 6.7 : 1). De cette façon, il a été capable de calculer que la diastéréosélectivité totale de cette alkylation était de 98.1 : 1.9 (d.r. >50 : 1). Ensuite, en une seule étape, le produit alkylé a été réduit à l'aide du LAH dans l'éther afin de produire l'alcool **54**. Ce dernier a été protégé *in situ* sous forme d'éther de tétrahydropyranyle à l'aide du 3,4-DHP et une quantité catalytique de *p*TsOH dans le DCM afin de produire l'alcool désiré **71**. Un aliquot de cet alcool intermédiaire a été dérivé sous forme d'éther

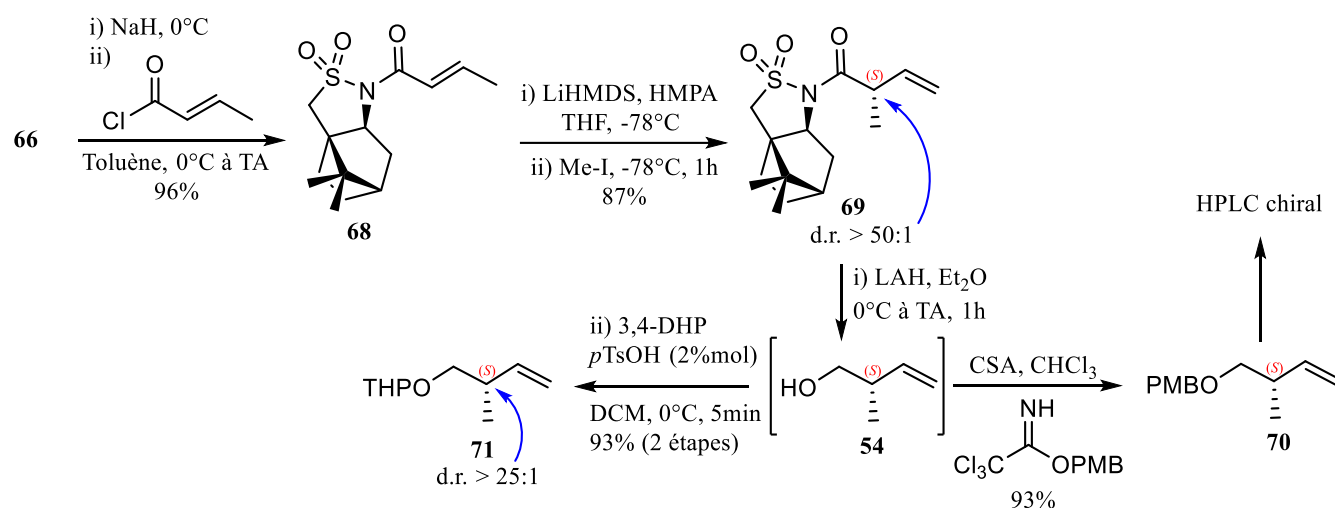


Schéma 24

paraméthoxybenzylique (PMB) **70**. Ce dérivé a ensuite été utilisé en chromatographie chirale afin de déterminer l'excès énantiomérique de l'alcool **54** (voir annexe 3 pour les détails). Il n'était pas souhaité d'utiliser l'éther THP pour la chromatographie chirale, car le groupement THP introduit un deuxième centre chiral et donc, 4 stéréoisomères de cet alcool auraient dû être séparés en chromatographie chirale, rendant la quantification beaucoup plus complexe. L'analyse du chromatogramme suite à une analyse

par HPLC chirale a permis de conclure que le ratio énantiomérique de l'éther PMB **70** était 96.4 : 3.6 par intégration, projetant un ratio diastéréomérique de > 25 : 1 pour **71**.

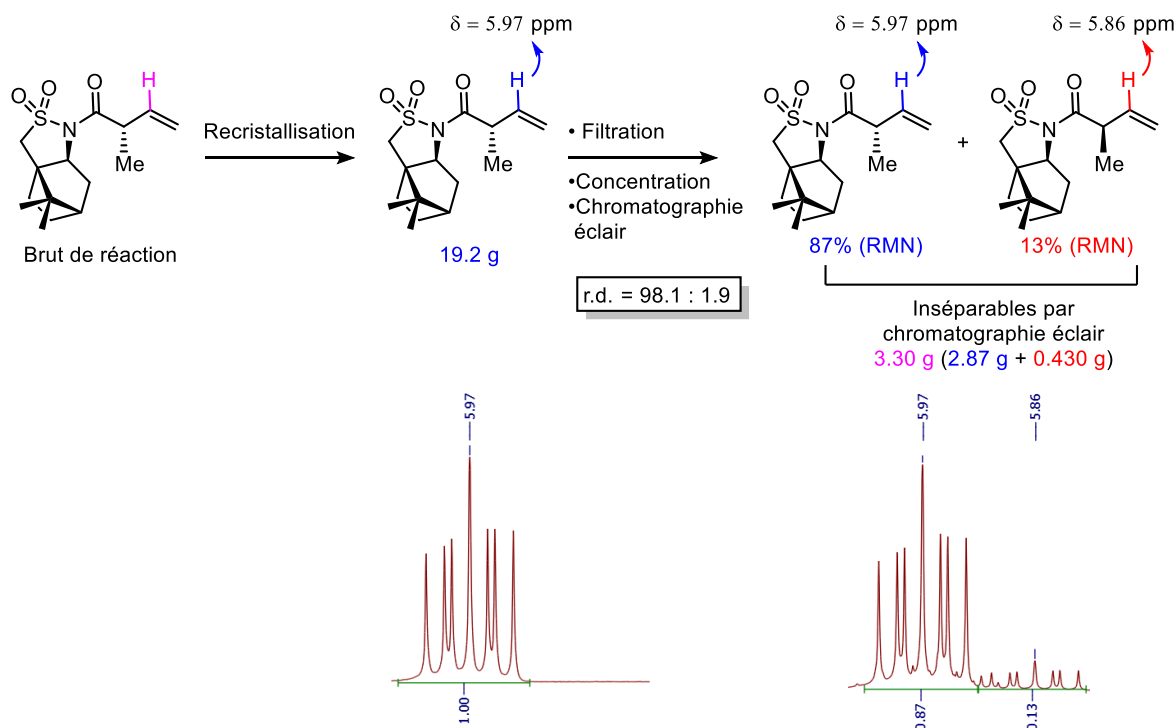


Schéma 25

1.3.2. Alkylation de la lactone dinorcholanique

1.3.2.1. Addition organométallique via réactif de Grignard

La réaction d'alkylation de la lactone **52**, protégée sous forme d'éther silylé TBDPS **72**, a été testée initialement via l'addition de réactifs de Grignard simples. Plusieurs essais (**Tableau 4**) d'alkylation avec des réactifs de Grignard commerciaux (entrées 1-3 et 5-6) et ceux générés *in situ* au laboratoire (entrée 4) ont échoué à donner l'hémicétal désiré **73**. Suite à ces essais, le produit désiré n'était jamais obtenu et la réaction donnait des mélanges de produits complexes difficilement identifiables. À la lumière de ces résultats, il a été possible de conclure que l'alkylation par réactifs de Grignard de **72** donnait des produits difficilement identifiables et était non reproductible. Nous avons raisonné que, suivi de l'alkylation, l'alcoolate de magnésium généré pouvait ouvrir de façon réversible, menant à une hydroxycétone, pouvant subir une seconde alkylation et, au total, mener à un mélange complexe de lactone, d'hémicétal, hydroxycétone, et produits de dialkylation. Il n'a pas été possible d'identifier la

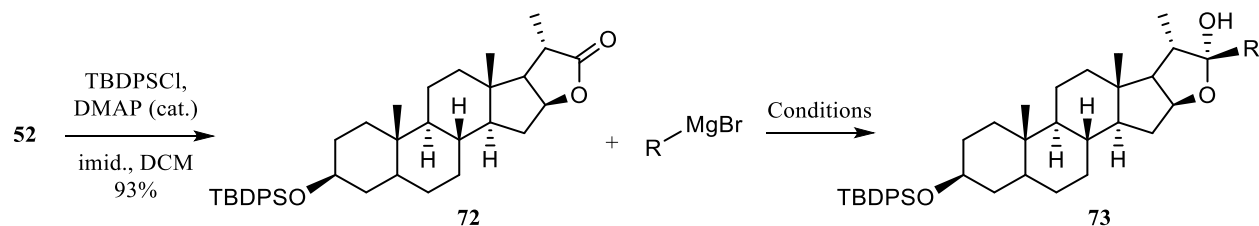
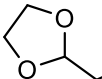


Schéma 26

Tableau 4. Essais d'alkylation de 72 par des réactifs de Grignard

Entrée	Réactif	Solvant	Température	Rendement
1	AllylMgBr (1.2 eq.)	THF	-78°C	0%
2	AllylMgBr (5.0 eq.)	THF	-78°C	0%
3	AllylBr (1.3 eq), iPrMgCl (1.25 eq)	THF	-40°C	0%
4	AllylBr (1.1 eq), Mg ⁰ (2.5 eq.)	Ether	0 à 40°C, puis -78°C	0%
5	VinylMgBr (1.1 eq)	THF	-78°C	0%
6	 (1.5 eq)	THF	-78°C	0%

nature des sous-produits de ces réactions, alors nous sommes passés à une autre stratégie d'alkylation. Parallèlement, d'autres auteurs ont aussi été incapable d'alkyler cette lactone par réactifs de Grignard.¹³¹

1.3.2.2. Addition organométallique via alkylolithien (alcool)

La stratégie suivante a été d'alkyler 72 par un réactif d'alkyllithium, généré à partir de l'échange lithium-iodure d'un iodure d'alkyle. Afin de préparer un substrat modèle, la version racémique de l'alcool 54, 74, était disponible commercialement et a été achetée. Cet alcool a subséquemment été protégé sous forme d'éther THP (Schéma 27) à l'aide du 3,4-DHP afin de générer un groupement protecteur résistant aux conditions fortement basiques d'échange Li-I. L'alcène 75 a ensuite subi une hydroboration à l'aide du 9-BBN dans le THF, puis un clivage au peroxyde d'hydrogène et hydroxyde de sodium afin d'obtenir l'alcool subséquent 76. Cet alcool a ensuite été substitué par un atome d'iodure via la réaction d'Appel, donnant donc accès à 77, une source d'iodure d'alkyle similaire au substrat chiral nécessaire afin de performer les tests d'alkylation de 72, illustrés au Schéma 28.

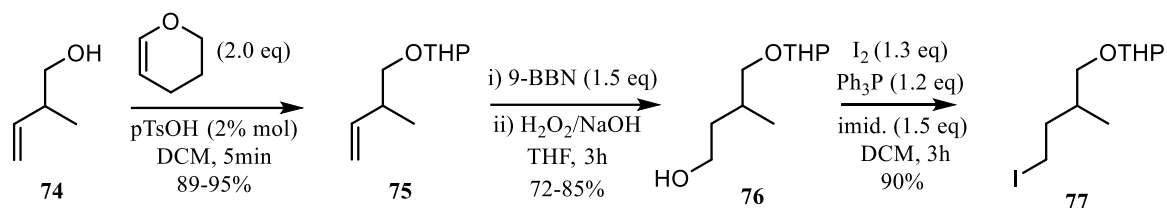


Schéma 27

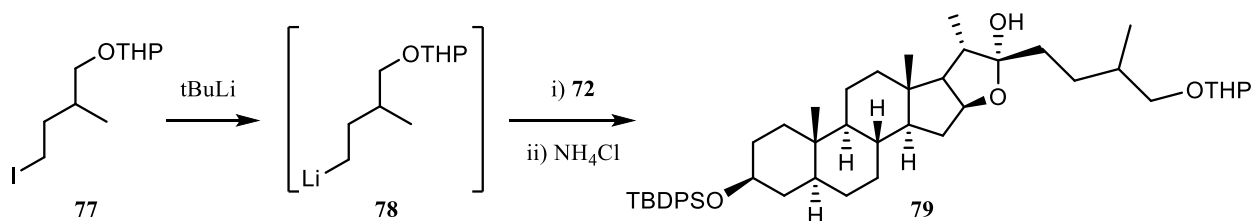


Schéma 28

Suite à la préparation du réactif iodé **77**, plusieurs conditions réactionnelles ont été testées afin d'arriver à l'hémicétal désiré **79**. Ces réactions ont demandé des conditions rigoureusement anhydres car l'intermédiaire **78** se protonne en présence d'eau, détruisant ainsi la tête réactive du substrat. Initialement, les échanges lithium-iode du substrat **77** ont été effectués dans l'éther anhydre. Le réactif d'alkyllithium a été généré *in situ* par échange lithium-halogène de l'iode. Cet échange étant un phénomène à l'équilibre entre l'espèce lithiée et l'espèce iodée, un deuxième équivalent de *tert*-BuLi est nécessaire afin de réagir avec l'intermédiaire *tert*-BuI. Ce dernier est consommé afin de produire deux gaz (isobutylène et *tert*-butane, **Schéma 29**) et un sel (LiI), des sous-produits tous incapables de contribuer à l'équilibre de retour vers l'espèce de départ. C'est ainsi que l'intermédiaire **78** a été généré

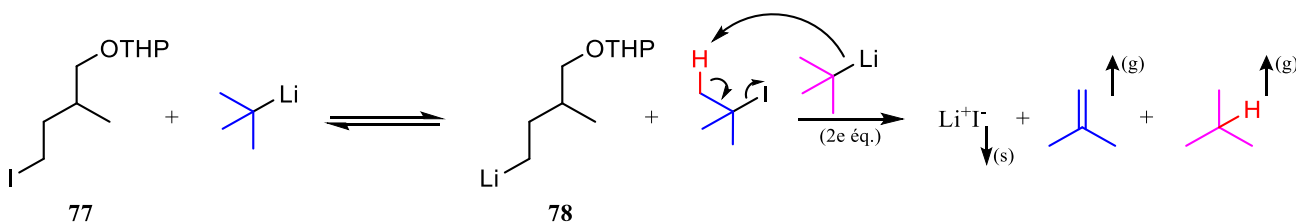


Schéma 29

in situ. L'ajout de la lactone, préalablement dissoute dans l'éther, a été effectué par transfert via canule directement dans le milieu réactionnel. Il a été observé que **72** n'était que très peu soluble dans l'éther, alors nous avons changé ce solvant par le THF. Il a été initialement supposé que la réaction d'alkylation

était lente à -78°C, température nécessaire à la génération de l'alkyllithium, donc plusieurs essais d'alkylation ont été effectués à cette température en laissant ensuite réchauffer lentement le milieu réactionnel jusqu'à 0°C ou à température ambiante (**Tableau 5**, entrées 1-3). Un autre facteur ayant amélioré nos rendements a été l'ajout de pentane dans la génération de **78**. Le pentane, un solvant apolaire, a favorisé l'équilibre vers les produits de la réaction montrés au **Schéma 29** en abaissant la solubilité du sel Li-I généré, sans toutefois abaisser les rendements (entrées 4-6). L'ajout de 1.0 équivalent de la lactone **72** à 1.5 - 1.8 équivalents d'agent alkylant généré **78** n'a pas réussi à consommer pleinement l'électrophile (entrées 1 et 4). Nous avons donc opté pour la génération de 2.0 équivalents de **78** dans ce cas. Ainsi, lorsque 1.0 équivalent de **72** a été ajouté à 2.0 équivalents de **78**, une conversion complète a été observée après seulement 5 minutes, constatée par CCM. Ces conditions ont donné un rendement de 66 % pour l'hémicétal **79** désiré (entrée 5). En utilisant les mêmes conditions sur plus grosse échelle (entrée 6), un rendement de 82% a été obtenu, expliqué par le fait que même en conditions anhydres, une petite quantité d'eau est présente dans le milieu et sur petite échelle, l'eau a pu détruire un plus grand pourcentage du réactif.

Tableau 5. Optimisation de l'alkylation de **72** par des réactifs d'alkyllithium

Entrée	Réactifs ^a	Solvant	Conditions ^e	Rendement (79)
1	<i>tert</i> -BuLi (4.05 eq), 77 (2.0 eq)	Et ₂ O	-78°C, 2 h	45%
2	<i>tert</i> -BuLi (3.10 eq), 77 (1.5 eq)	Et ₂ O	-78°C à 0°C, 3 h	58%
3	<i>tert</i> -BuLi (4.05 eq), 77 (2.0 eq)	Et ₂ O	-78°C 2 h, puis 0°C	39%
4	<i>tert</i> -BuLi (3.65 eq), 77 (1.8 eq) ^b	Et ₂ O : pentane (2 : 3)	-78°C, 1 h	53%
5	<i>tert</i> -BuLi (4.05 eq), 77 (2.0 eq) ^{b,c}	Et ₂ O : pentane (2 : 3)	-78°C, 5 min	66%
6	<i>tert</i> -BuLi (4.05 eq), 80 (2.0 eq) ^{b,d}	Et ₂ O : pentane (2 : 3)	-78°C, 5 min	82% ^f

a) Une solution de **72** (1.0 eq.) a été canulée dans le réactif lithié généré *in situ*. b) **72** dissous dans THF/pentane (2 : 3)

c) échelle de 100 mg d) échelle de 5g e) Temps où NH₄Cl a été ajouté f) Rendement de **81**

Suite au développement d'une stratégie d'alkylation de **72** qui menait à des rendements acceptables, l'alcène **71** précédemment préparé a été transformé en iodure chiral requis **80** (**Schéma 30**) via l'alcool **79**, utilisant les conditions développées lors de la synthèse de l'iodure racémique **77**.

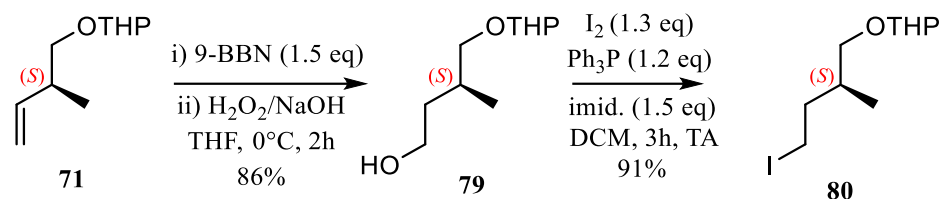


Schéma 30

Une méthodologie a donc été développée afin d'arriver au substrat désiré fonctionnalisable **81**. La suite logique a donc été de libérer l'alcool protégé sous forme de tétrahydropyranyle afin d'obtenir l'alcool **82**. La prochaine étape aurait été de soumettre ce dernier à des conditions de substitution (Schéma 31) afin d'obtenir le substrat azoté requis **50**, identifié dans l'analyse rétrosynthétique au Schéma 17. Cette transformation aurait pu être envisagée via nosylation par réaction de Mitsunobu afin d'obtenir le substrat nosylé désiré **83**, précurseur du coeur spiroaminocétal de l'azaspiracide 1 par Carter *et al.* (Schéma 8). Une autre stratégie viable aurait été la substitution de cet alcool via tosylation puis déplacement par NaN₃ afin d'obtenir l'azoture désiré **84**, précurseur du noyau spiroaminocétal comme vu en fin de synthèse du fragment EFGHI de l'azaspiracide 1 par Evans *et al.* (Schéma 7). Ces deux substrats nécessitaient l'obtention de l'alcool terminal libre **82**.

Agréablement, le groupement protecteur THP a bien su résister aux conditions fortement hostiles de l'échange lithium-halogène. La déprotection subséquente de cet éther de THP a donc été entreprise afin d'obtenir **82**. Malheureusement, malgré plusieurs tentatives de déprotection de l'éther de tétrahydropyranyle dans des conditions douces, aucune de nos tentatives n'a fourni l'alcool **82** sans qu'il n'y ait cyclisation pour générer le spirocétal **85** correspondant. Il était connu que la fonction hémicétale était sensible aux acides, donc les conditions les plus douces ont été sélectionnées seulement. Les trois premiers essais (Tableau 6, entrées 1-3) ont été tentés en utilisant des conditions classiques de déprotection de THP, soit un acide de Brønsted en quantité catalytique. Malheureusement, seulement **85** était formé. Ceci a été raisonné par le fait que les conditions acides favorisaient la formation d'un oxonium de l'hémicétal, qui était ensuite cyclisé via l'attaque du nucléophile interne, soit l'alcool libre. À notre surprise, pousser ces réactions au reflux a pu permettre de fournir le spirocétal désilylé **86**, qui est l'analogue dihydrogénéné de la yamogénine **48**. Nous avons donc cherché des conditions de déprotection douces et sans acide. Trois conditions utilisant des réactifs doux et/ou en conditions catalytiques ont été répertoriées (entrées 4-6). Ces conditions sont : l'utilisation d'une quantité catalytique de décaborane dans le méthanol¹³², l'utilisation d'une quantité catalytique de DDQ

dans ACN/H₂O¹³³ ou l'utilisation du chlorure de lithium et l'eau dans dans le DMSO à haute température.¹³⁴ Ces conditions, bien que douces, ont échoué à générer l'alcool **82** sans spirocyclisation. À la lumière de ces expériences, il a donc été raisonné que la présence de l'alcool libre dans le milieu cyclise spontanément sans l'aide d'acide, comme l'amine **12** a cyclisé spontanément sans acide sur l'hémicétal **13** lors de la synthèse de l'azaspiracide **1** (Schéma 7). Cette transformation s'effectue fort probablement par autoprotolyse de l'hémicétal dans les deux cas.

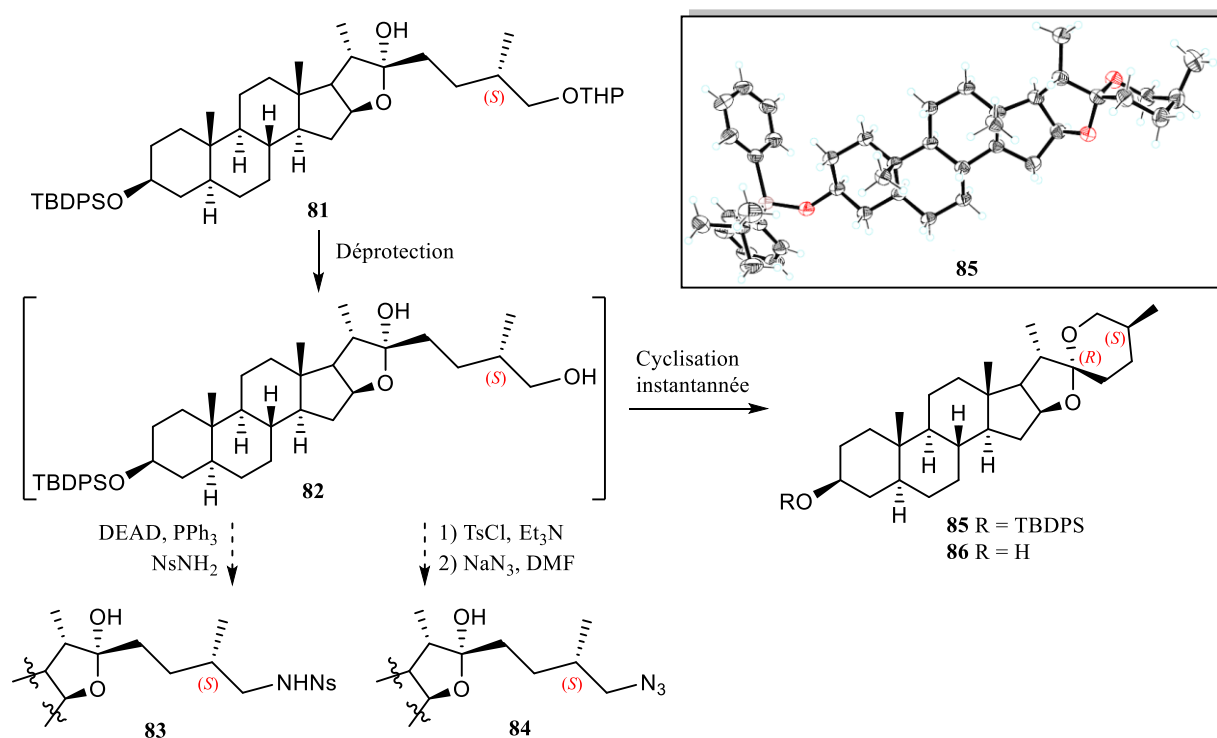


Schéma 31

Tableau 6. Tentatives de déprotection de l'ether **81**

Entrée	Réactifs	Solvant	Conditions	Produit ^a
1	<i>p</i> TsOH (0.10 eq)	MeOH	t.a., 3h	85
2	PPTS (0.10 eq)	MeOH	t.a., 3h	85
3	5% HCl (0.10 eq)	THF	t.a., 1h	85
4	B ₁₀ H ₁₄ (0.10 eq)	MeOH	t.a., 1.5h	85
5	DDQ (0.20 eq)	ACN/H ₂ O (20 : 1)	48h, rt	85^b
6	LiCl (5 eq), H ₂ O (10 eq)	DMSO	90°C, 6h	85

a) Le rendement n'a pas été calculé b) 20% de conversion (RMN)

Il est intéressant de noter que le méthyl en position 26 de **85** se montre en position axiale. Suite à l'échec de l'obtention du diol **82** désiré, nous nous attendions à obtenir une conformation positionnant le méthyl de l'anneau F en position équatoriale, plus bas en énergie ($\Delta G_{axial} - \Delta G_{équatoriale} \approx +1.7 \text{ kcal/mol}$). Il a été proposé que la stabilisation anomérique était responsable de cette conformation inattendue, le produit ayant été obtenu dans des conditions thermodynamiques. Suite à l'analyse conformationnelle des 4 spirocétals possible, il a été déterminé que la forme **85-a** (Schéma 32) contenait zéro effets anomères, que **85-b** (conformation attendue) et **85-c** contenaient un seul effet anomère, et que **85** comportait deux effets anomères ($\approx -1.5 \text{ kcal/mol}$ chacun). La conformation de **85** était surprenante et nous nous attendions pas à obtenir le spirocétal du produit naturel yamogénine **48**. À notre grande surprise, nous avons procédé à la première synthèse diastéréosélective de ce phytostéroïde naturel.

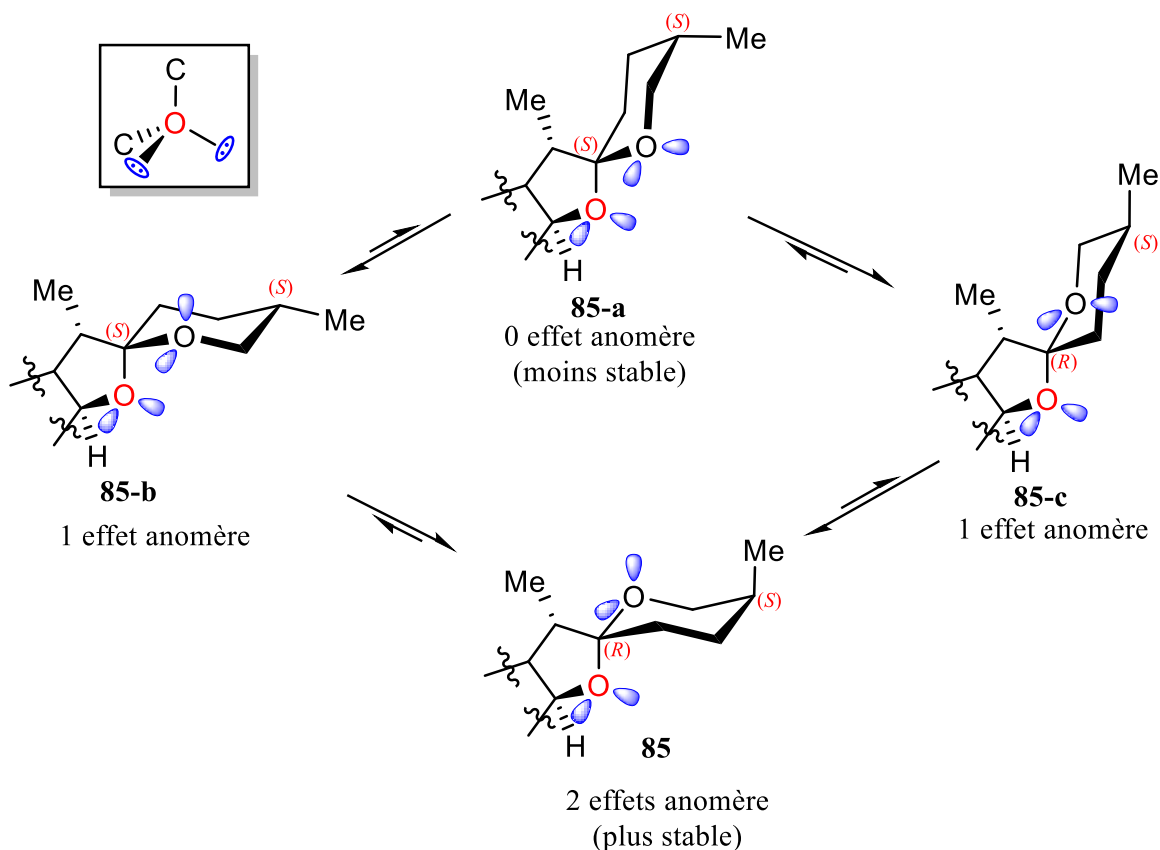


Schéma 32

1.3.2.3. Addition organométallique via alkyllithien (aldéhyde)

Il a donc été impossible d'obtenir l'alcool **82** afin d'incorporer une source d'azote nécessaire au produit naturel. Nous avons donc proposé que l'amine puisse être installée via une amination réductrice sur l'aldéhyde correspondant. L'alkylation de la lactone **72** a donc été effectuée avec des aldéhydes protégés sous forme d'acétals. La stratégie reposait sur le traitement subséquent de cet acétal en conditions acides afin d'obtenir l'hémiacétal correspondant, qui ensuite aurait été soumis à des conditions d'amination réductrice afin d'obtenir l'amine désirée, qui, dans les conditions légèrement acides de l'amination réductrice, aurait pu cycliser directement sur l'hémicétal et nous donner directement notre produit final.

Une stratégie similaire a été employée par le groupe de Dawei Ma dans la synthèse d'un intermédiaire avancé lors de la synthèse totale des communesines A et B (**Schéma 33**).¹³⁵ Dans cette synthèse, les auteurs ont préparé l'hémiacétal **87**, qui a ensuite été traité dans des conditions d'amination réductrice à l'aide de l'acétate d'ammonium et du cyanoborohydrure de sodium. Les auteurs ont proposé que l'aldéhyde, la forme ouverte du lactol **88**, a subi une amination réductrice afin de générer l'amine **89**. De cet intermédiaire a pu découler deux voies. Les auteurs ont proposé que, via la voie A, il y a une autre tautomérisation entre l'hémiacétal – aminoaldéhyde **90**, cet aldéhyde ayant pu subir une amination réductrice par l'amine générée dans l'étape précédente, produisant l'iminium **91**. Cet iminium a pu ensuite être piégé par l'amine secondaire afin de donner l'aminol **92** désiré. Une voie B est proposée et implique par la génération de iminium **93** par protonation de l'héminal puis expulsion d'une molécule d'eau. L'amine primaire a pu donc facilement cycliser afin de donner le produit désiré **92**.

Une méthodologie a donc été conçue afin d'exploiter une voie de synthèse similaire. La lactone **72** a été exposée aux lithiens correspondants des iodures **94** et **95** (**Schéma 34**) dans les mêmes conditions optimisées qu'au **Tableau 5**. L'alkylation a été effectuée avec des synthons à 3 et 4 carbones en négligeant le méthyle asymétrique nécessaire afin de tester la faisabilité de la réaction de cyclisation en imaginée. Ensuite, les hémiacétals **96** et **97** ont été exposés à des conditions acides faibles afin de libérer l'aldéhyde subséquent, qui a été isolé sous forme d'hémiacétals **98** et **99** en rendement quantitatifs dans les 2 cas. Une analyse RMN complète 2D a été effectuée sur le substrat **98** afin de confirmer la création de l'acétal désiré avant de se lancer dans les essais d'amination réductrice (**Figure 23**). Dans ce cas, il a été déterminé que le ratio diastéréomérique au carbone 25 était de 1.3 : 1. Ayant

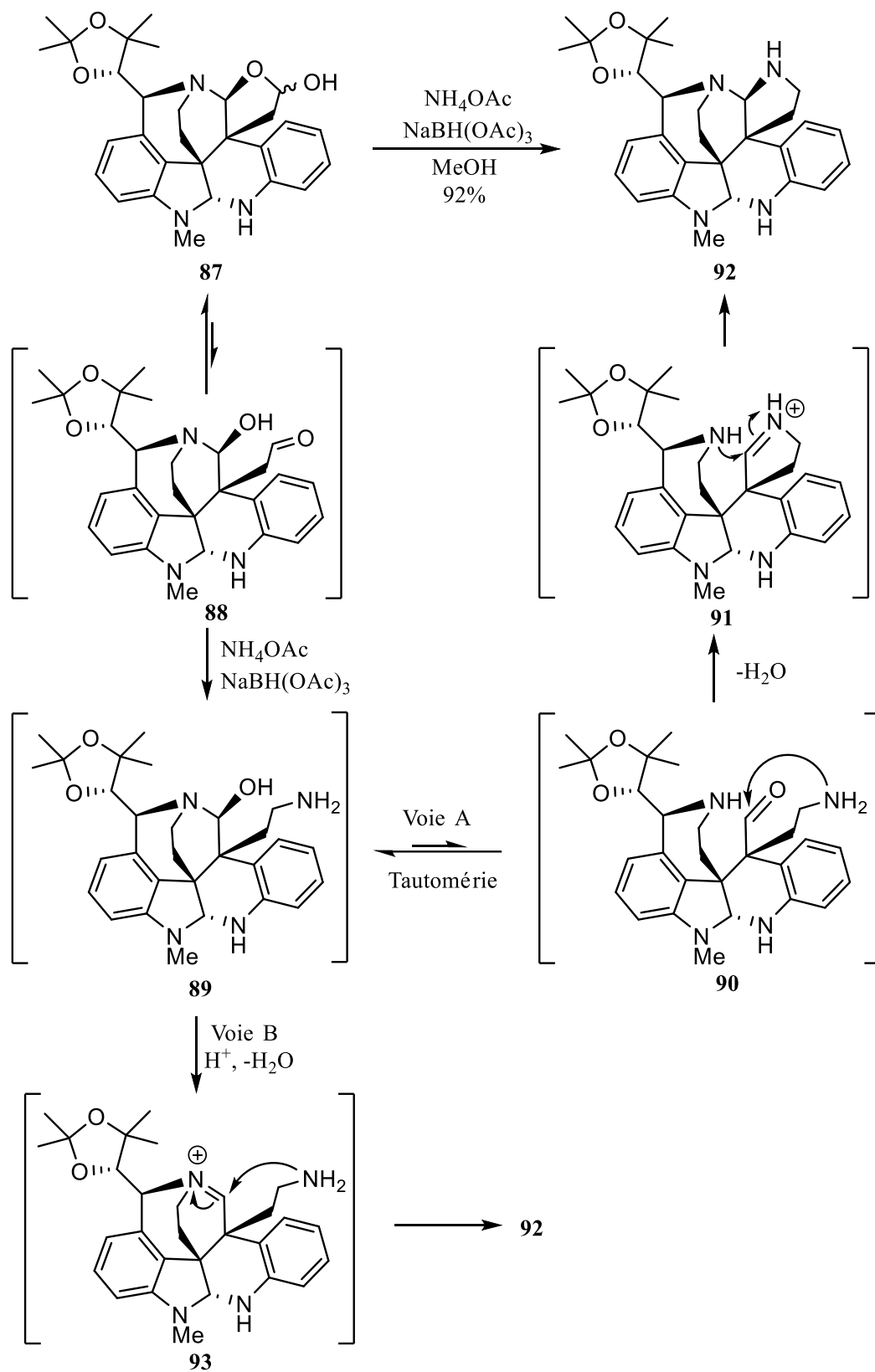


Schéma 33

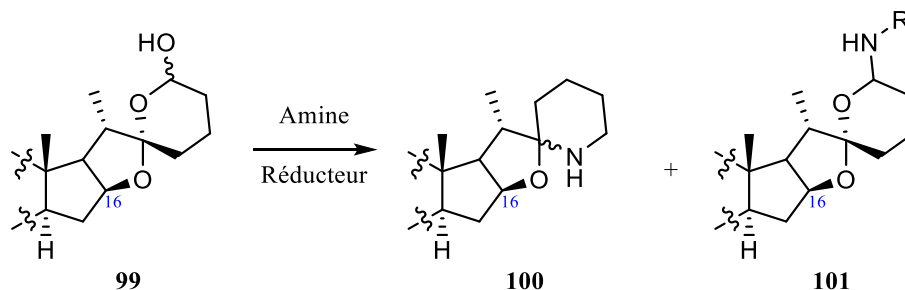


Schéma 35

Tableau 7. Tentatives de cyclisation en cascade de **99**

Entrée	Amine ^a	Réducteur	Conditions	100	101
1	BnNH ₂ (10 eq.)	NaBH ₃ CN ^b	23°C, 16h	0%	0%
2	BnNH ₂ (10 eq.)	NaBH ₃ CN ^b	70°C, 1.5h ^c	0%	0%
3	BnNH ₂ (10 eq.) ^d	NaBH ₃ CN ^b	70°C, 1.5h	0%	37% ^e
4	NH ₄ OAc (10 eq)	NaBH(OAc) ₃	23°C, 72h	0%	0%
5	NH ₄ OAc (10 eq)	NaBH(OAc) ₃	70°C, 16h	0%	0%
6	BnNH ₂ (10 eq.)	NaBH(OAc) ₃	70°C, 1.5h	0%	16% ^e

a) Les réactions ont été effectuées dans le MeOH sur une échelle de 20 mg avec 0.10 éq. AcOH b) pH ajusté à 5 avec AcOH c) Conversion complète du PD mais produit isolé a décomposé d) échelle de 100 mg. e) Produit instable et décompose dans le CDCl₃ et CD₃OD.

non-transformation du spirocétal en spiroaminocétal), ainsi que les signaux aromatiques de la benzylamine et un signal de proton labile N-H, confirmant son incorporation indiquant la formation de l'aminocétal **101**. D'autres tentatives de formation du spiroaminocétal **100** utilisant le triacétoxyborohydrure de sodium réducteur et l'acétate d'ammonium comme source d'amine (**Tableau 7**, entrées 4-6) ont mené à la même conclusion que l'utilisation de la benzylamine. En raison de la faible solubilité du substrat **99** dans le méthanol, nous avons employé le système MeOH : DCM (9 : 1), mais ceci créait un problème de solubilité du sel d'ammonium NH₄OAc nécessaire à la réaction. Au final, aucune transformation n'a été observée en utilisant NH₄OAc, mais seulement en utilisant BnNH₂. En plus d'avoir été obtenu en faibles rendements, **101** était instable lorsque solubilisé dans le CDCl₃ et CD₃OD, compliquant l'analyse RMN. Une chromatographie sur couche mince du produit **101** purifié révélait une décomposition totale du produit après seulement 2 h dans le tube RMN. Le mécanisme pouvant expliquer la formation de ce produit est détaillé au **Schéma 36**. Le produit non-désiré obtenu **101** peut être mécanistiquement raisonné par le fait que l'iminium **103**, résultant de la condensation

d'une amine sur l'aldéhyde **102**, est piégé plus rapidement par l'hémiacétal que le réducteur choisi afin d'obtenir l'aminocétal **101**. Des conditions utilisant des tamis moléculaire dans des solvants anhydres n'ont pas favorisé la formation de **100**, démontrant que l'ion iminium n'est pas réduit mais toujours piégé intramoléculairement par l'hémiacétal.

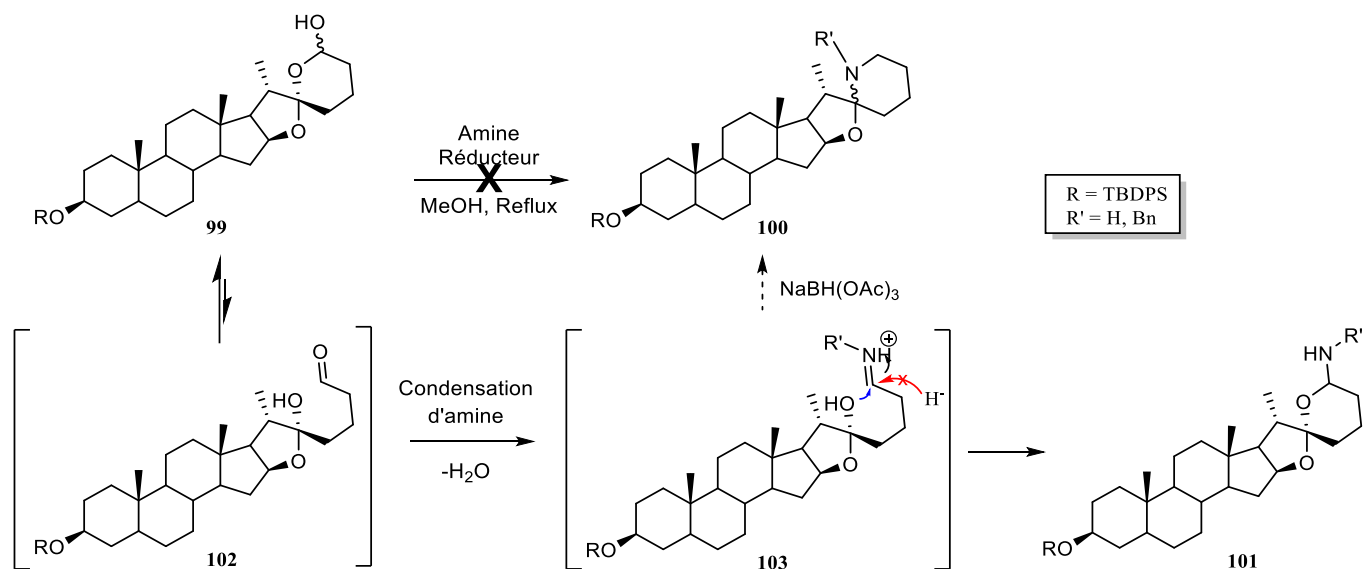


Schéma 36

CHAPITRE 2. SYNTHÈSE SUR GRANDE ÉCHELLE DE LA TOMATIDINE

2.1. Rôle des auteurs

La synthèse détaillée de la tomatidine est couverte en détails dans l'article « Gram-scale Synthesis of Tomatidine : a steroid alkaloid with antibiotic properties against persistent forms of *Staphylococcus aureus* » présenté ici-bas.

J'ai, Chad, été responsable de la planification, synthèse, purification, caractérisation de tous les intermédiaires menant à la synthèse de la tomatidine. Ceci a été possible grâce aux leçons apprises suite aux multiples échecs antérieurs, à la lecture de beaucoup de littérature et des judicieux conseils de mon superviseur et de mes collègues chimistes.

Le P^r Malouin et son équipe ont découvert l'activité biologique de tomatidine au début des années 2010.

Le P^r Éric Marsault a été mon superviseur lors ce projet. Il m'a guidé dans cette synthèse depuis le tout début. Son expérience et sa connaissance profonde de la chimie organique ont été d'un grand support tout au long du développement de cette synthèse.

2.2. Gram-scale Synthesis of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Antibiotic Properties Against Persistent Forms of *Staphylococcus aureus*

L'article suivant a été soumis au *European Journal of Organic Chemistry* le 13 Janvier 2020 et a été accepté le 2 avril 2020 (<https://doi.org/10.1002/ejoc.202000051>).

Sommaire (version française)

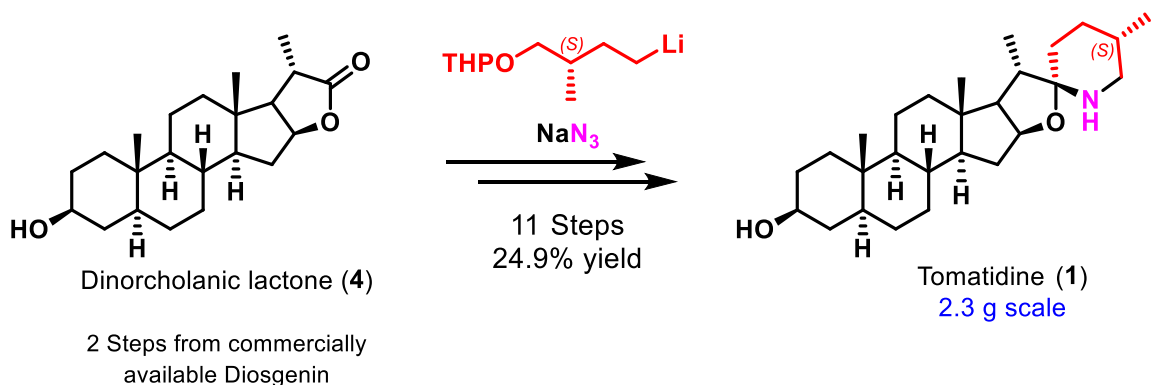
Dans ce manuscrit, nous rapportons la première synthèse de la tomatidine. La tomatidine est un nouvel agent antibactérien dans le traitement de *Staphylococcus aureus* (S. Aureus) et de S. aureus résistant à la méthicilline (SARM). La synthèse a été réalisée en 11 étapes avec un rendement global de 24.9% (séquence linéaire la plus longue). Cette méthodologie pratique utilise une insertion convergente d'un synthon suivie d'une séquence d'ouverture de cycle / substitution d'azote / fermeture de cycle, ce qui nous a permis de générer la tomatidine sur une échelle de >2g. Le défi synthétique de la génération énantiosélective de la fonction spiroaminocétale a été résolu par une condensation-réduction combinée d'un groupement azoture. La tomatidine a récemment suscité de l'intérêt en raison de sa capacité unique à tuer les formes persistantes de *S. aureus* tout en renforçant simultanément l'efficacité des antibiotiques de la classe des aminoglycosides contre les souches naïves de *S. aureus* et de SARM. Une synthèse sans précédent de la yamogénine, un phytostéroïde intermédiaire important de cette synthèse, est aussi rapportée.

Gram-scale Synthesis of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Antibiotic Properties Against Persistent Forms of *Staphylococcus aureus*

Chad Normandin[†], François Malouin[‡] and Eric Marsault^{†*}

[†]*Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, Canada*

[‡]*Département de biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1K 2R1, Canada*



Author Information

Email: -

Notes: The authors declare no competing financial interest.

Supporting Information Availability

- Comparison of ¹³C NMR data from natural and synthetic **1**
- Enantiomeric excess determination method for **8**
- Crystal data and structure refinement tables for **1** and **16**
- ¹H and ¹³C Spectra for all new compounds

Abstract

In this manuscript we describe the first synthesis of tomatidine **1**. Tomatidine is a novel antibacterial agent in the treatment of *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) and *Methicillin-Resistant S. aureus* (MRSA). The synthesis has been accomplished in 11 steps and 24.9 % overall yield (longest linear sequence). This practical methodology involves a convergent synthon insertion followed by a ring opening/nitrogen substitution/ring-closing sequence, which allowed us to generate **1** on > 2g scale. The synthetic challenge to the enantioselective generation of the unusual spiroaminoketal moiety was solved through a combined 2-in-1 reduction-condensation of an azide group. Tomatidine recently generated interest based on its unique ability to kill persistent forms of *S. aureus* while simultaneously potentiating the antibiotic efficacy of aminoglycoside antibiotics against wild type strains of *S. aureus* and MRSA. An unprecedented synthesis of important phytosteroid intermediate yamogenin is also reported.

Introduction

In 2017, the World Health Organisation (WHO) identified *S. aureus*, MRSA and several other antibiotic-resistant bacterial species as “high-priority” targets for the development of new antibiotics in the fight against resistance.¹ MRSA are resistant to β -lactam antibiotics and often multi-drug resistant. They are widely found in hospital-acquired infections but also increasingly in community-acquired infections.² *S. aureus* and MRSA can adopt two phenotypes, prototypical (WT) and its small-colony variants (SCV).³ The slow-growing SCV is often the result of a point mutation affecting the electron transport chain. Slow growth, intracellular persistence and high biofilm production all contribute to protect SCVs from antibiotic action, thereby forming a reservoir of bacteria and leading to persistence.^{2,4} SCVs can revert to the virulent WT upon cessation of treatment, leading to infection relapses.⁵ To break this WT-SCV-WT cycle it is imperative to find new antibiotics that target the persistent forms of bacteria. We recently demonstrated that tomatidine **1** targets an important protein for energy production in *S. aureus*, namely the ATP synthase, via its *c* subunit.⁶ Our team also reported that **1** possesses potent inhibitory activities against the SCVs of *S. aureus* and MRSA with minimal inhibitory concentrations (MIC) as low of 0.06 $\mu\text{g/mL}$.⁷ Moreover, we previously elucidated the structure-activity relationship of **1** in order to optimize its inhibition potential against SCVs⁷, and also demonstrated that **1** potentiates up to 16-fold the activity of aminoglycoside antibiotics such as gentamicin or tobramycin against WT *S. aureus*.^{8,9} Altogether, this makes tomatidine a synthetic target of interest for use in combination with aminoglycosides to treat simultaneously the WT and SCV forms of *S. aureus* and MRSA.

Tomatidine **1** is a steroid alkaloid found in more than 60 species of the *Solanum* plant genus.¹⁰ It was first isolated and characterized in 1948 as its naturally occurring C3-glycosylated form tomatine **2** (Figure 1), which bears the Gal-Glu(Glu-Xyl) tetrasaccharide.¹¹ **1** is biosynthesized from plant cholesterol via a series of GLYCOALKALOID METABOLISM (GAME) enzymes (Figure 2).¹²

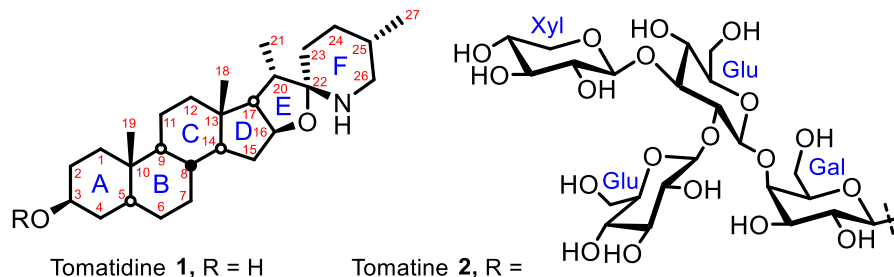


Figure 1. Tomatidine **1** and its glycosylated form Tomatine **2**

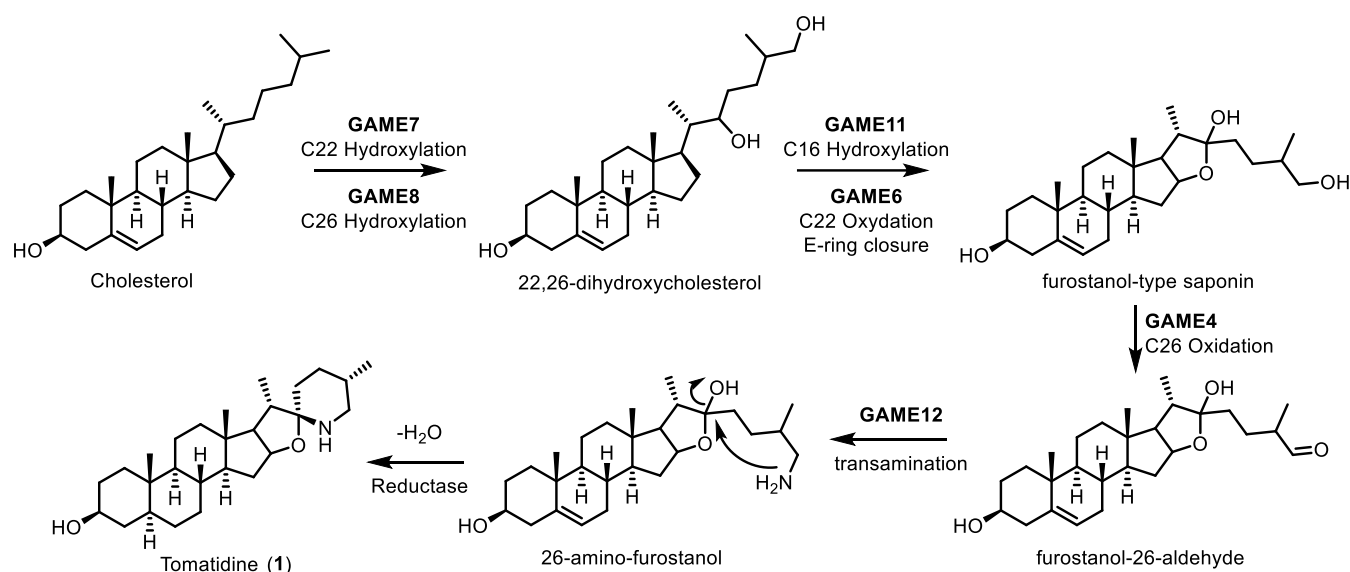
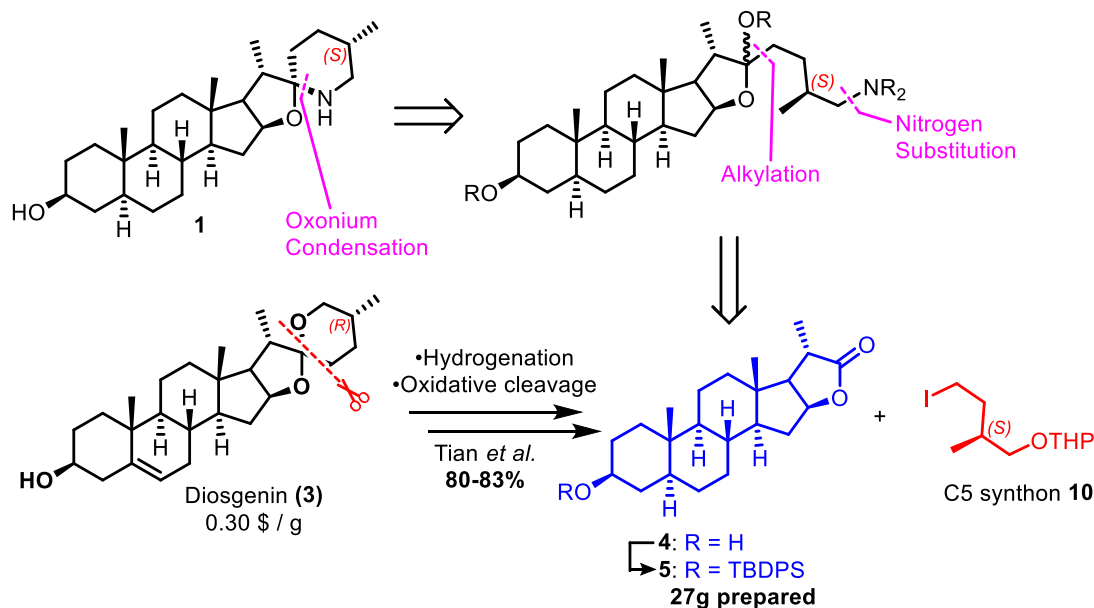


Figure 2. Biosynthetic pathway of **1** starting from plant cholesterol

Extraction is currently the only means to access **1** and **2**, both present in low concentrations in the leaves, roots and fruits of *Solanum* plants. Tomatine **2** needs to be subjected to acidic hydrolysis to deliver its aglycon form tomatidine. Tomatidine is commercially available yet expensive, typically as a hydrochloride salt of *ca* 85% purity. Tomatidine is a complex steroid alkaloid bearing six rings (A-F, Figure 1), 12 asymmetric centers and a spiroaminoketal moiety (rings E-F). This uncommon moiety, otherwise known as oxazaspiroketal or spiro-N,O-ketal, also occurs naturally in other biologically active compounds such as the herbicide hydantocidin¹³, the marinal phycotoxins azaspiracid A-E^{14,15} as well as the immunosuppressant sanglifehrin A-D.¹⁶ The commercial price of tomatidine (US\$ 1,000-1,500/g) and low natural abundance are important limitations to its further exploitation as an antibiotic, let alone the generation of analogs to further optimize its profile. Thus, the development of a synthetic route becomes a strategic objective for its future exploitation as an antibiotic. Recently, 25-

nortomatidine was synthesized by Czajkowska-Szczykowska *et al.* and was only obtained as the minor diastereoisomer in the synthesis of 25-norsolasodine.¹⁷

As a part of our research program to further exploit tomatidine and its derivatives toward novel antibiotics, our first objective was to construct **1** in an efficient and cost-effective manner using readily available and low cost starting materials, with the goal to achieve gram-scale synthesis. Accordingly, dinorcholanic lactone **5** (Scheme 1) appeared naturally as a potent building block to **1**. Indeed, **5** encompasses the correct stereochemistry on rings A-D as well as on position 20. Following the methodology developed by Tian *et al.*, Pd-catalyzed hydrogenation, iodine-mediated Baeyer-Villiger oxidation / lactonisation of **3** to **4** and subsequent protection of the C3 alcohol as TBDPS yielded dinorcholanic lactone **5**, ready for alkylative introduction of the side chain precursor of ring F.¹⁸ Diosgenin is a triterpene phytosteroid isolated industrially from Fenugreek^{19,20} and can be purchased at a very low cost (US\$ 0.30/g). Following this method, **5** was prepared on a 27g scale in 3 steps in yields of 80-83%.



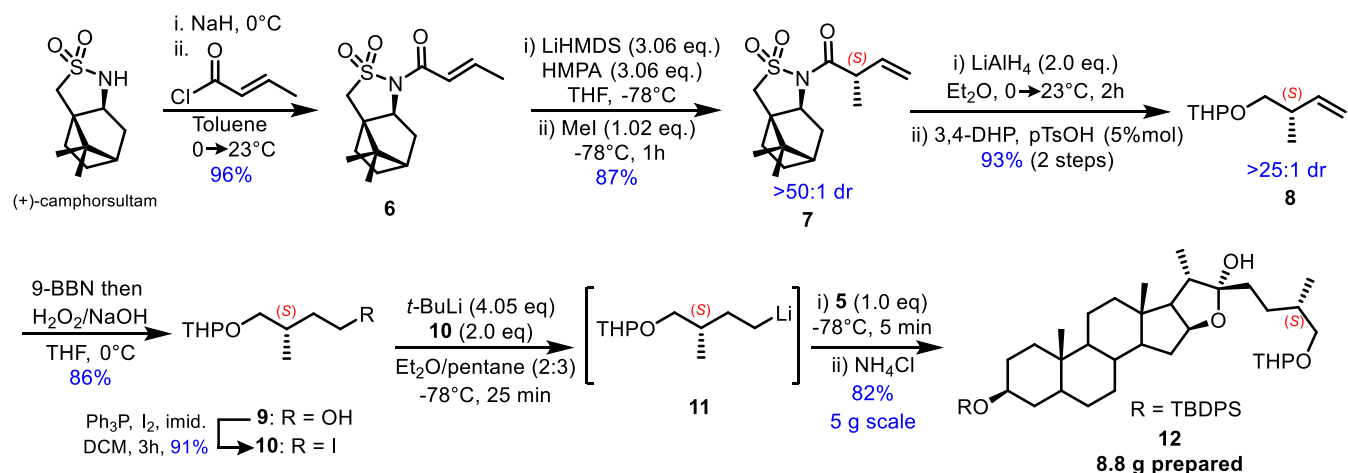
Scheme 1. Retrosynthetic analysis of **1**

The A-E rings of **1** could be accessed in this manner, leaving the diastereoselective construction of the E-F ring spiroaminoketal to complete. We then relied on the asymmetric construction of synthon **10**, with the goal to introduce it via addition of its organolithium intermediate **11**. No easily-accessible

precursor to this chiral synthon could be identified from the commercial chiral pool, which led us to consider its asymmetric synthesis.

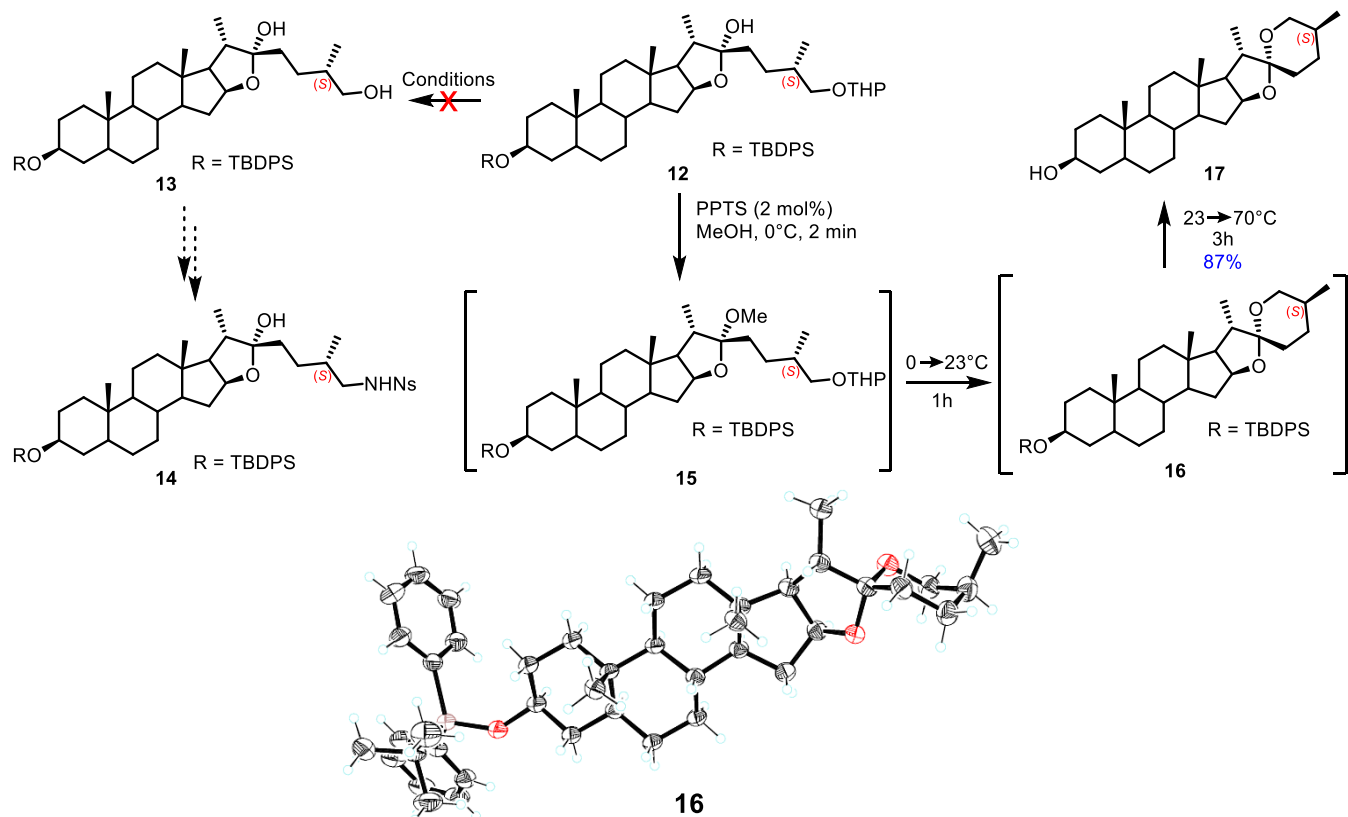
Results and discussion

The synthesis of synthon **10** (Scheme 2) was initiated by crotonoylation of commercial (+)-camphorsultam using crotonoyl chloride, which yielded crystalline **6** in 96% yield. Alkylation of this adduct using LiHMDS and methyl iodide in THF/HMPA yielded alkylated crotonoyl camphorsultam **7** in 87% yield and >50:1 d.r. (NMR).^{21,22} The more common Evan's oxazolidinone chiral auxiliary was considered as well, however previous reports revealed poor diastereoselectivity using methyl iodide as an electrophile (d.r. < 3.6:1).²³ **7** was then reductively cleaved using LAH in anhydrous diethyl ether, yielding the corresponding primary alcohol which was protected *in situ* as tetrahydropyranyl ether (OTHP) to deliver alkene **8** in 93% yield over 2 steps. Telescoping the two previous steps circumvents the volatility of the intermediate alcohol, and the associated low yields during its recovery. The enantiomeric excess of free alcohol **8** was determined to be >93% by chiral HPLC of its PMB ether **8a** (see supporting information). Hydroboration of alkene **8** using 9-BBN followed by oxidative workup with sodium hydroxide and hydrogen peroxide²⁴ yielded primary alcohol **9** in 86% yield. After multiple attempts, Grignard-type alkylations of **5** with corresponding bromide derivative of **9** were not fruitful, so consequent iodination of alcohol **9** using modified Appel reaction conditions²⁵ yielded terminal iodide **10** in 91% yield. This iodide then underwent an iodide-lithium exchange²⁶ using *t*-butyllithium to generate organolithium intermediate **11** *in situ*, to which was added **5** at -78°C to generate hemiketal **12** in 82% yield on 5 g scale. A total of 8.8 g of **12** was prepared in this manner.



Scheme 2. Synthesis of synthon **10** and hemiketal **12**

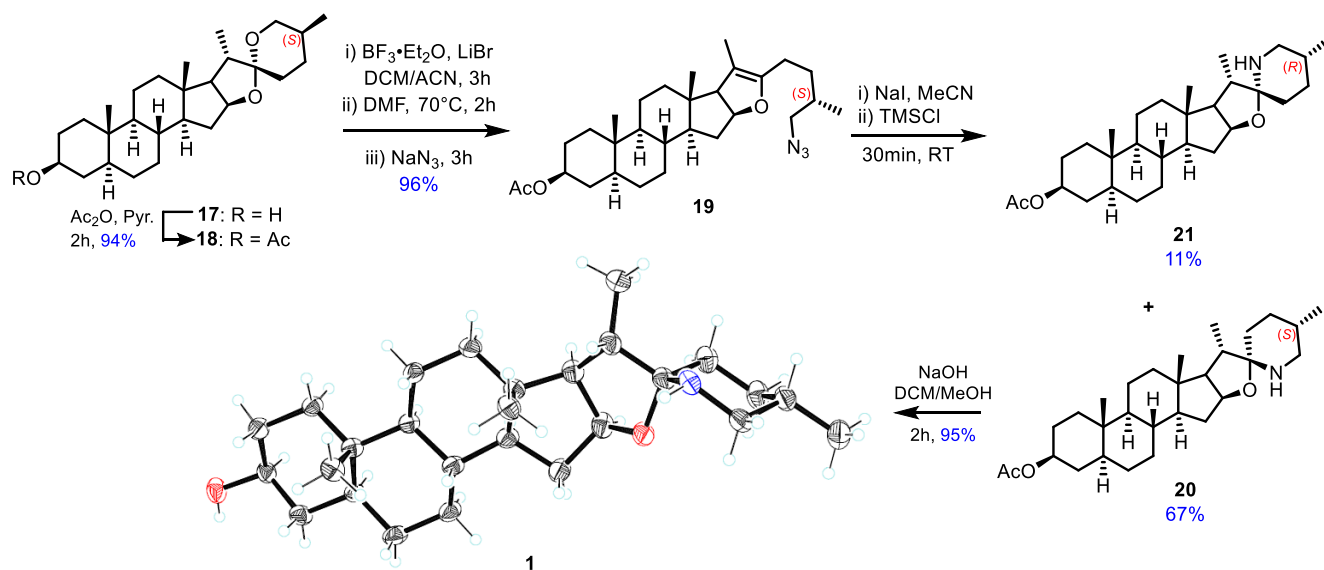
With hemiketal **12** in hand, we set out to deprotect the tetrahydropyranyl group, with the future goal to chemoselectively discriminate the alcohol and hemiketal moieties. Objectively, we could then transform the primary alcohol into an amine precursor, exemplified by **14** via Fukuyama-Mitsunobu nosylation (Scheme 3).²⁷ Disappointingly, using even the mildest OTHP deprotection conditions known (e.g. B₁₀H₁₄ (cat.) in MeOH²⁸, DDQ (cat.) in wet MeCN²⁹, LiCl in wet DMSO³⁰) failed to yield deprotected terminal alcohol **13** and repeatedly yielded spiroketal **16** (Scheme 3). This reaction was further studied and revealed a 3-part sequential transformation. When hemiketal **12** was subjected to pyridinium *p*-toluenesulfonate (cat.) in methanol, ketal **15** was obtained very rapidly (< 2 minutes at 0°C). Reaction was then brought to room temperature for 1 h to yield spiroketal **16**, product of intramolecular oxonium trapping of the deprotected primary alcohol. It was found that further heating of the reaction could yield desilylated spiroketal **17**.



Scheme 3. Synthesis of intermediate **17** and ORTEP diagram of intermediate **16** (50% Probability ellipsoids)

A single crystal X-ray structure of intermediate **16** could be generated (Scheme 3), revealing the silylated derivative of phytosteroid yamogenin **17**, the 25*S* diastereomer of diosgenin **3**. This is not the first report of synthetic yamogenin³¹, but is however the first reported diastereoselective synthesis. Yamogenin was previously reported to possess anti-hyperlipidemic effects.³² Interestingly, as opposed to tomatidine, the methyl group in position 27 prefers an axial orientation, likely resulting from the anomeric stabilization by the two oxygen atoms of the spiro center. With spiroketal **16** in hand and the correct stereochemistry installed on C25, we set out to introduce a nitrogen source at the C26 position, before reclosing the ring to generate the spiroaminoketal moiety. Various protocols have been developed to open and functionalize the F ring of spiroketal sapogenin steroids, often requiring strong oxidative and acidic conditions³³ or hazardous reagents.³⁴ The softer and highly efficient Lewis acid-mediated ring opening of steroidal spiroketals reported in 2015 by Tian *et al.* was therefore used in our synthesis.³⁵ However, this methodology was not compatible with the silyl ether protecting group of **16**. In light of this conclusion, the TBDPS ether was removed during the spiroketalisation step by refluxing

the mixture for 3h to easily generate secondary alcohol **17** (Scheme 3) in 87% yield.³⁶ The C3 alcohol was then reprotected as the acetate **18** in 94% yield (Scheme 4). The corresponding ω -halo enol ether was then generated using BF_3 etherate and lithium bromide, followed by heating in DMF. The intermediate bromide was then substituted *in situ* by simple addition of sodium azide to the mixture to afford ω -azido enol ether **19** in 96% yield. With the pivotal nitrogen group now installed on position C26, reduction of the azide to the amine and subsequent cyclization onto the enol ether was achieved in one step using *in situ* generation of trimethylsilyl iodide (TMSI), obtained by addition of TMSI to NaI in MeCN. In this reaction, TMSI acts both as a reducing agent and also generates a mildly acidic medium that protonates the enol ether to the corresponding oxonium, necessary for addition of the generated amine. This methodology was previously used in the synthesis of Solasodine **21**, the C22-C25 diastereomer of Tomatidine.^{35,37} In similar manner, we exposed azide **19** to TMSI in MeCN at room temperature to generate tomatidine acetate **20** in 67% yield, as well as its diastereoisomer **21** in 11% yield. Tomatidine acetate **20** was then subjected to ester hydrolysis to afford **1** in 95% yield. Crystallization of synthetic **1** from MeOH afforded crystals suitable for x-ray diffraction, confirming its identity (Scheme 4). This synthesis successfully delivered 2.35 g of synthetic Tomatidine.



Scheme 4. Completion of the synthesis and ORTEP diagram of Tomatidine **1** (50% Probability ellipsoids)

Conclusion

In summary, we have developed an 11-step convergent sequence to access gram-scale quantities of **1** with an overall yield of 24.9 % for the longest linear sequence, starting from cheap and commercially available diosgenin **3**. This was achieved through the synthesis of pivotal intermediate **17**. This synthesis, which we are currently refining for larger scale, will open a pathway to larger amounts of materials to further study the role and structure-activity relationship of Tomatidine **1** and analogs as antibiotic agents against persistent forms of *S. aureus* and MRSA.

Acknowledgments

Financial support from PROTEO and the Cystic Fibrosis Foundation of Canada is gratefully acknowledged. EM is a member of the FRQNT-funded PROTEO Network as well as the FRQS-funded Quebec Network for Drug Discovery.

Experimental Section

General

Unless otherwise stated, all reactions were performed in flame-dried or oven-dried glassware under an atmosphere of nitrogen using Teflon-coated stir bars. Reactions ran above room temperature (23 °C) were heated in an oil bath. Unless otherwise stated, commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich with the highest available purity and used without purification. Tetrahydrofuran (THF), methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), *N,N*-dimethylformamide (DMF) were purchased as commercial DriSolv[®] solvent bottles, stored and used under argon atmosphere. Diethyl ether (Et₂O) and pentane were distilled over sodium under argon and kept dry using activated MS3Å. Flash chromatography was performed on Silicycle SiliaFlash P60 silica gel (230–400 mesh, 40–63 µm particle size). Automated flash chromatography was performed using a Biotage Isolera ISO-1SV automated flash chromatography system. Thin layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed Silicycle SiliaPlate 250 µm thickness, 60 Å porosity F-254 precoated plates from Silicycle. Compounds were visualized with UV light (254 nm) and stained with cerium ammonium molybdate

followed by heating (steroids) or potassium permanganate (KMnO₄) followed by heating (non-steroids). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Bruker Ascend 400 spectrometer. Residual chloroform (CHCl₃) signals were used as internal reference for ¹H (δ = 7.26 ppm) and ¹³C (δ = 77.1 ppm) spectra. The following abbreviations were used to describe NMR multiplicities: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, sext = sextuplet, sept = septuplet and m = multiplet. Coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). Infrared (IR) spectra were obtained on an ABB Bomem MB104 spectrophotometer using a diamond-attenuated total reflectance (ATR) accessory. All substances were directly applied on the ATR unit. Frequency of absorption is given in cm⁻¹. High-resolution mass spectra (HRMS) were obtained on a Nexera (Shimadzu) LC-QTOF mass spectrometer coupled to maXis (Bruker) mass spectrometer (ESI) using sodium formate as internal standard. Melting points were measured on an Electrothermal MEL-TEMP 3.0 melting point apparatus. X-Ray diffraction was performed on a KAPPA APEX-DUO (Bruker) diffractometer device using a Cu radiation source.

Experimental Procedures

2-(((*S*)-2-methylbut-3-en-1-yl)oxy)tetrahydro-2*H*-pyran (8). Under inert atmosphere, a solution of **7** (28.3 g, 95.2 mmol, prepared as described by Cooksey, P. *et al.*) in Et₂O (900 mL), was added dropwise over 2 h to a suspension of lithium aluminum hydride (7.22 g, 190 mmol, 2.0 eq.) in anhydrous Et₂O (150 mL) at 0°C. The resulting grey suspension was stirred vigorously and allowed to warm to room temperature. When **7** was fully consumed as followed by TLC (1 h), the mixture was slowly quenched by successive addition of water (7.2 mL), 15% aqueous NaOH (7.2 mL) then water (21.6 mL). The suspension was dried over sodium sulfate and stirred vigorously for 30 min. The resulting suspension was then filtered through a glass-fritted funnel and the residue washed repeatedly with Et₂O (3x 100 mL) while manually stirring the slurry in the funnel before filtering again. Filtrates were combined and Et₂O was removed *via* fractional distillation until minimal Et₂O remained (ca. 50 mL). A small aliquot was kept for PMB derivatization and enantiomeric excess determination (see supporting information). To this concentrated solution was added DCM (250 mL), 3,4-Dihydro-2*H*-pyran (17.4 mL, 66.5 mmol, 2.0 eq.) and *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (362 mg, 1.90 mmol, 0.02 eq.). This mixture was stirred until the alcohol was fully consumed as evidenced by TLC (5 min). The mixture was then diluted with DCM (200 mL) then washed with saturated aqueous NaHCO₃ (40 mL). The organic layer

was dried with sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (step gradient 0, 2.5, 5, 7.5, 10% EtOAc:Hex) yielded tetrahydropyranyl ether **8** (15.1 g, 93%) as a light yellow oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 5.85-5.75 (m, 1H); 5.05 (dd, 1H, *J* = 8.8 Hz, 1.2 Hz); 4.99 (dd, 1H, *J* = 5.2 Hz, 1.2 Hz); 4.57 (t, 1H, *J* = 3.6 Hz); 3.88-3.82 (m, 1H); 3.59 (ddd, 1H, *J* = 36.4 Hz, 9.6 Hz, 6.8 Hz); 3.51-3.46 (m, 1H); 2.46 (quint, 1H, *J* = 6.8 Hz); 1.86-1.77 (m, 1H); 1.74-1.65 (m, 1H); 1.61-1.48 (m, 4H); 1.03 (dd, 3H, *J* = 6.8 Hz, 4.4 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 141.4, 114.1, 98.9, 94.8, 72.2, 63.0, 62.2, 37.9, 30.8, 25.6, 19.9, 19.6, 16.8.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 3036, 2943, 1652, 1635, 1124, 1074, 1035, 965, 820, 754.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₁₀H₁₈O₂: 193.1199 [M+Na]⁺ found : 193.1201 [M+Na]⁺.

(3S)-3-methyl-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)butan-1-ol (9). Under inert atmosphere, a 0.5M solution of 9-BBN (47.6 mL, 23.8 mmol, 2.2 eq.) was added dropwise to a cooled (0°C) solution of **8** (1.84 g, 10.8 mmol) dissolved in anhydrous THF (20 mL). The mixture was then slowly warmed to room temperature until **8** was consumed as evidenced by TLC (*ca* 1 h). The mixture was then cooled to 0°C before a premixed solution of 2M aqueous sodium hydroxide (16.2 mL, 32.4 mmol, 3 eq.) and aqueous 30% hydrogen peroxide (15.5 mL, 151 mmol, 14 eq.) was added dropwise. This mixture was then warmed to room temperature and stirred 1.5h before

brine (100 mL) was added. The resulting mixture extracted with Et₂O (3x 50 mL), combined organic fractions were dried on sodium

sulfate, concentrated *in vacuo* and the product purified by flash chromatography (Step gradient, 0, 10, 20, 30, 35, 40, 45, 50% EtOAc:Hex) to yield alcohol **9** (1.74 g, 86%) as a colorless oil.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.59-4.56 (m, 1H); 3.86-3.80 (m, 1H); 3.70 (sept, 1H, *J* = 4.8 Hz); 3.66-3.55 (m, 2H); 3.52-3.47 (m, 1H); 3.28-3.18 (m, 1H); 2.49 (br s, 1H, *OH*); 1.90 (sept, 1H, *J* = 2.8 Hz); 1.83-1.75 (m, 1H); 1.72-1.48 (m, 7H); 0.93 (dd, 3H, *J* = 6.8 Hz, 1.6 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 99.2, 99.0, 73.4, 73.2, 62.4, 61.2, 38.0, 31.3, 30.6, 25.5, 19.6, 17.7.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 3389, 2937, 2871, 1454, 1352, 1200, 1119, 1060, 1023, 974, 902, 867, 810.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₁₀H₂₀O₃: 211.1305 [M+Na]⁺ found : 211.1308 [M+Na]⁺.

2-((S)-4-iodo-2-methylbutoxy)tetrahydro-2H-pyran (10). Iodine (1.19 g, 4.70 mmol, 1.3 eq.) was added in portions to a solution of PPh₃ (1.14 g, 4.34 mmol, 1.2 eq.) and imidazole (369 mg, 5.43 mmol, 1.5 eq.) in DCM (15 mL) previously cooled to 0°C. This mixture was stirred 20 minutes at 0°C before a solution of **9** (681 mg, 3.62 mmol) in DCM (10 mL) was added dropwise over 10 minutes. The mixture was then warmed to RT and stirred vigorously for 3h. It was then diluted with DCM (25 mL), quenched with a 10% sodium thiosulfate solution (10 mL) and the resulting aqueous layer was extracted with DCM (3x 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (15 mL), dried on sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0-5% EtOAc:Hex) afforded **10** (1.00 g, 91%) as a colorless oil. (NOTE: **product is light-sensitive and needs to be stored in a cold, dark room under inert atmosphere**).

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.55 (q, 1H, *J* = 3.6 Hz); 3.85-3.80 (m, 1H); 3.62-3.56 (m, 1H); 3.52-3.47 (m, 1H); 3.32-3.26 (m, 1H); 3.24-3.17 (m, 2H); 2.08-1.96 (m, 1H); 1.91-1.77 (m, 2H); 1.75-1.65 (m, 2H); 1.61-1.49 (m, 4H); 0.93 (dd, 3H, *J* = 6.8 Hz, 4.4 Hz).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 98.9, 72.0, 62.3, 38.2, 34.7, 30.8, 25.6, 19.6, 16.5, 5.1.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 2938, 2869, 1453, 1351, 1183, 1119, 1063, 1031, 973, 903, 868, 814.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₁₀H₂₉IO₂: 321.0322 [M+Na]⁺ found : 321.0328 [M+Na]⁺.

(4S,6aS,8aS,9S,10R,11aS)-4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyl-10-((3S)-3-methyl-4-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)butyl)octadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10-ol (12). In a flame-dried flask under inert atmosphere, freshly titrated *t*-BuLi³⁸ (1.63 M in Pentane, 21.3 mL, 34.7 mmol, 4.05 eq.) was added dropwise to a mixture of **10** (5.12 g, 17.2 mmol, 2.0 eq.) previously dissolved in 13 mL anhydrous Et₂O and 19 mL anhydrous pentane at -78°C. This mixture was stirred for 25 min at -78°C until a solution of **5** (5.02 g, 8.58 mmol) in pentane (25 mL) / anhydrous THF (20 mL) was transferred dropwise *via canula*. The mixture was stirred vigorously at -78°C for 5 min, quenched with sat. aqueous NH₄Cl (50 mL), then warmed to room temperature. Water (75 mL) was added and the mixture was transferred to a separatory funnel. The aqueous layer was extracted with Et₂O (3x 75 mL) and the combined organic phases were dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0-30% EtOAc:Hex) afforded **12** (5.35 g, 82%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.68-7.66 (m, 4H); 7.43-7.34 (m, 6H); 4.58-4.53 (m, 2H); 3.87-3.83 (m, 1H); 3.61-3.48 (m, 3H); 3.21 (ddd, 1H, *J* = 25.6 Hz, 9.6 Hz, 6.0 Hz); 1.05 (s, 9H); 1.01 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.94 (dd, 3H, *J* = 6.8 Hz, 4.8 Hz); 0.80 (s, 3H) 0.75 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 135.9, 135.1, 129.5, 127.5, 110.6, 98.9, 81.5, 77.4, 72.9, 62.9, 62.3, 56.4, 54.4, 44.9, 41.0, 40.0, 38.5, 37.1, 36.5, 35.6, 35.2, 33.6, 32.4, 31.8, 30.8, 28.7, 27.7, 27.1, 25.6, 21.1, 19.7, 19.3, 17.3, 16.5, 15.7, 12.5.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 3421, 2929, 2855, 1451, 1380, 1110, 1062, 1028, 903, 863, 818, 740, 701, 612.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₄₈H₇₂O₅Si: 779.5041 [M+Na]⁺ found : 779.5046 [M+Na]⁺.

(4*S*,5'*S*,6*aS*,8*aS*,9*S*,10*R*,11*aS*)-5',6*a*,8*a*,9-

tetramethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-*b*]furan-10,2'-pyran]-4-ol (17). *p*-Toluenesulfonic acid monohydrate (44.1 mg, 232 μmol, 0.02 eq) was added to a stirring mixture of **12** (8.77 g, 11.6 mmol) in anhydrous MeOH (350 mL) at 0°C. After 2min, hemiketal **12** (*R_f* 0.5, 25% EtOAc:Hex) was fully transformed into **15** (*R_f* 0.85) as evidenced by TLC. The mixture was then warmed to room temperature. After 1 h, ketal **15** was fully transformed into spiroketal **16** (*R_f* 0.90) by TLC. A crystal of **16** suitable for X-ray analysis could obtained by *in vacuo* concentration of an aliquot at this stage followed by purification by flash chromatography then slow crystallization from MeOH. The mixture was then heated to 70°C. After 3h, TLC showed complete conversion of intermediate **16** to **17** (*R_f* 0.40). The mixture was then concentrated *in vacuo* and purified by flash chromatography (0-50% EtOAc:Hex) to yield **17** (4.19 g, 87%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.39 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz); 3.94 (dd, 1H, *J* = 10.8 Hz, 2.4 Hz); 3.58 (sept, 1H, *J* = 4.8 Hz); 3.29 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz); 1.07 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz); 0.98 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.81 (s, 3H); 0.75 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 109.7, 81.1, 71.4, 65.3, 62.2, 56.4, 54.5, 44.9, 42.3, 40.7, 40.2, 38.3, 37.1, 35.7, 35.3, 32.4, 31.7, 31.6, 28.7, 27.2, 26.1, 25.9, 21.2, 16.6, 16.2, 14.5, 12.5.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 3255, 2928, 2847, 1448, 1368, 1221, 1174, 1056, 983, 953, 920, 849, 774.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₂₇H₄₄O₃: 439.3183 [M+Na]⁺ found : 439.3178 [M+Na]⁺.

(4S,5'S,6aS,8aS,9S,10R,11aS)-

5',6a,8a,9tetramethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10,2'-pyran]-4-yl

acetate (18). Acetic anhydride (7.60 mL, 80.5 mmol, 8.0 eq.) was added to a stirring mixture of **17** (4.19 g, 10.1 mmol) previously dissolved in pyridine (40 mL) at 50°C. This mixture was stirred at 50°C until **17** was fully consumed as shown by TLC (*ca* 2h), cooled to room temperature then poured into stirred ice-cold water (150 mL). The resulting suspension was stirred vigorously for 15 min while cooled in an ice bath then vacuum filtered using a Buchner funnel. The resulting solid was washed with ice-cold water and further dried by vacuum filtration 15 min before it was dried *in vacuo* to yield **18** (4.35 g, 94%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.67 (sept, 1H, *J* = 4.8 Hz); 4.39 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz); 3.94 (dd, 1H, *J* = 10.8 Hz, 2.8 Hz); 3.29 (d, 1H, *J* = 11.2 Hz); 2.01 (s, 3H); 1.07 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz); 0.98 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.83 (s, 3H); 0.75 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8, 109.8, 81.0, 73.8, 65.2, 62.1, 56.3, 54.3, 44.7, 42.2, 40.6, 40.1, 36.8, 35.7, 35.2, 34.1, 32.2, 31.8, 28.6, 27.6, 27.2, 26.0, 25.9, 21.6, 21.1, 16.6, 16.2, 14.4, 12.4.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 2923, 2898, 2847, 1724, 1447, 1379, 1240, 1174, 1132, 1049, 1028, 987, 920, 854, 611.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₂₉H₄₆O₄: 481.3288 [M+Na]⁺ found : 481.3277 [M+Na]⁺

(4S,6aS,8aS,11aS)-10-((S)-4-azido-3-methylbutyl)-6a,8a,9-trimethyl-

2,2a,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-hexadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-

b]furan-4-yl acetate (19). Under inert atmosphere, dry LiBr (8.01 g, 92.2 mmol, 10.0 eq.) and **18** (4.23 g, 9.22 mmol) were loaded into a flame-dried 500ml round bottom flask. DCM (80 mL) and anhydrous MeCN (40 mL) were then added and the mixture stirred vigorously before BF₃•Et₂O (11.4 mL, 92.2 mmol, 10.0 eq.) was added dropwise. The reaction was stirred vigorously at RT for 3h until two slightly more polar spots (*R_f* 0.4 (major) and 0.35 (minor)) appeared. The mixture was **slowly** quenched with sat. aqueous NaHCO₃ (CAUTION : Vigorous gas generation) until no more bubbling occurred, diluted with water then extracted with DCM (3x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried on sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. The crude mixture was then dissolved in DMF (40 mL) and stirred at 70°C for 2h before addition of sodium azide (1.80 g, 27.7 mmol, 3.0 eq.). The mixture was stirred an additional 2h at this temperature then cooled to room temperature, diluted with water and extracted with DCM (3x 75 mL). The combined organic phases were washed with brine (40

mL), dried on sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0-15% EtOAc:Hex) yielded **19** (4.28 g, 96%) as a white waxy solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.74-4.64 (m, 2H); 3.23 (dd, 1H, *J* = 12.0 Hz, 5.6 Hz); 3.09 (dd, 1H, *J* = 12.0 Hz, 7.2 Hz); 2.45 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz); 2.18-2.07 (m, 3H); 2.01 (s, 3H); 1.57 (s, 3H); 0.96 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.83 (s, 3H); 0.65 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.5, 151.2, 103.9, 84.3, 73.5, 64.3, 57.6, 54.7, 54.2, 44.6, 43.5, 39.6, 36.7, 35.5, 34.9, 34.0, 33.0, 32.3, 31.4, 28.5, 27.4, 23.1, 21.4, 21.1, 17.4, 14.2, 12.2, 11.6.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 2915, 2845, 2095, 1731, 1449, 1367, 1237, 1029, 959, 896, 860, 664, 608.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₂₉H₄₅N₃O₃: 506.3353 [M+Na]⁺ found : 506.3340 [M+Na]⁺.

Tomatidine acetate (20) Under inert atmosphere, sodium iodide (2.93 g, 19.6 mmol, 2.2 eq) and **19** (4.30 g, 8.89 mmol) were dissolved in anhydrous MeCN (120 mL). This mixture was stirred for 30 min before a solution of freshly distilled trimethylsilyl chloride (2.60 mL, 20.4 mmol, 2.3 eq) in MeCN (20 mL) was added dropwise *via canula*. The resulting mixture was stirred for 30 min at room temperature, quenched with saturated aqueous sodium thiosulfate (20 mL), pH adjusted to 9-10 using 5% NaOH (8 mL) then concentrated under reduced pressure. The remaining suspension was extracted with chloroform (3x 75 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried with sodium sulfate, then concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0-40% EtOAc:Hex, 1% Et₃N) afforded **20** (2.73 g, 67%) and **21** (440 mg, 11%) as white solids.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.67 (sept, 1H, *J* = 4.8 Hz); 2.76-2.68 (m, 2H); 2.01 (s, 3H); 0.95 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz); 0.85 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); 0.83 (s, 3H); 0.81 (s, 3H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8, 99.2, 78.6, 73.8, 62.1, 55.8, 54.4, 50.4, 44.8, 43.2, 41.0, 40.3, 36.8, 35.7, 35.2, 34.1, 32.8, 32.3, 31.2, 28.7, 28.6, 27.6, 26.8, 21.6, 21.2, 19.5, 17.1, 16.0, 12.4.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 2919, 2847, 1727, 1451, 1365, 1237, 1132, 1030, 974, 888, 743, 660.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₂₉H₄₇NO₃: 458.3629 [M+Na]⁺ found : 458.3630 [M+Na]⁺.

Tomatidine (1) A 3M aqueous solution of NaOH (9.94 mL, 29.8 mmol, 5.0 eq.) was added to a solution of **20** (2.73 g, 5.96 mmol) previously dissolved in DCM (25 mL) and MeOH (75 mL). The mixture was then stirred at room temperature until **20** was fully consumed as shown by TLC (2h). pH was then adjusted to 7-8 using 1N HCl (*ca* 12 mL) and the mixture was concentrated *in vacuo*,

suspended in water (50 mL) then extracted with chloroform (3x 75 mL). The combined organic layers were dried on sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (10-60% EtOAc:Hex, 1% Et₃N) afforded Tomatidine **1** (2.35 g, 95%) as a white solid. A crystal suitable for X-ray analysis was obtained by slow crystallization from MeOH.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.12 (q, 1H, 8.4 Hz); 3.57 (sept, 1H, *J* = 4.8 Hz); 2.79-2.76 (m, 1H); 2.72 (t, 1H, *J* = 10.8 Hz); 2.01-1.95 (m, 1H); 0.95 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz); 0.85 (d, 3H, *J* = 6.4 Hz); 0.81 (s, 6H).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 99.2, 78.7, 71.4, 62.1, 55.9, 54.6, 50.4, 44.9, 43.2, 41.0, 40.4, 38.4, 37.1, 35.7, 35.2, 32.8, 32.5, 31.7, 31.2, 28.8, 28.7, 28.4, 26.8, 21.2, 19.5, 17.1, 16.0, 12.5.

FTIR-ATR (neat) ν (cm⁻¹) 3330, 2916, 2852, 1445, 1382, 1137, 1050, 975, 900, 874, 787, 657, 628.

HRMS-ESI (*m/z*) calcd for C₂₇H₄₅NO₂: 416.3523 [M+Na]⁺ found : 416.3520 [M+Na]⁺.

References

- (1) WHO. (2017) *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*, available at https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf
- (2) Craft, K.M.; Nguyen, J.M.; Berg, L.J.; Townsend, S.D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA): Antibiotic-Resistance and the Biofilm Phenotype. *Med. Chem. Commun.* **2019**, 10, 1231-1241.
- (3) Suwantararat, N.; Rubin, M.; Bryan, L.; Tekle, T.; Boyle, M.P.; Carroll, K.; Jennings, M.T. Frequency of Small-Colony Variants and Antimicrobial Susceptibility of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* in Cystic Fibrosis Patients *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, 90, 296-299.
- (4) Proctor, R.A.; von Eiff, C.; Kahl, B.C.; Becker, K.; McNamara, P.; Herrmann, M.; Peters, G. Small Colony Variants: a Pathogenic Form of Bacteria that Facilitates Persistent and Recurrent Infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, 4, 295-305.
- (5) Cao, S.; Huseby, D.L.; Brandis, G.; Hughes, D. Alternative Evolutionary Pathways for Drug-Resistant Small Colony Variant Mutants in *Staphylococcus Aureus*. *mBio.* **2017**, 8, e00358-17.
- (6) Boulet, M.L.; Isabelle, C.; Guay, I.; Brouillette, E.; Langlois, J.-P.; Jacques, P.-E.; Rodrigue, S.; Brzezinski, R.; Beauregard, P.B.; Bouarab, K.; Boyapelly, K.; Boudreault, P.-L.; Marsault, E.; Malouin,

F. Tomatidine is a Lead Antibiotic Molecule that Targets Staphylococcus Aureus ATP synthase Subunit C. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **2018**, 62, e02197-17.

(7) Chagnon, F.; Guay, I.; Bonin, M.-A.; Mitchell, G.; Bouarab, K.; Malouin, F.; Marsault, E. Unraveling the Structure-Activity Relationship of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Unique Antibiotic Properties Against Persistent Forms of Staphylococcus. Aureus *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 80, 2014, 605-620.

(8) Vermote, A.; Calenbergh, S.A. Small-Molecule Potentiators for Conventional Antibiotics against Staphylococcus Aureus. *ACS Infect. Dis.* **2017**, 3, 780-796.

(9) Mitchell, G.; Lafrance, M.; Boulanger, S.; Seguin, D.-L.; Guay, I.; Gattuso, M.; Marsault, E.; Bouarab, K.; Malouin, F. Tomatidine Acts in Synergy with Aminoglycoside Antibiotics Against Multiresistant Staphylococcus Aureus and Prevents Virulence Gene Expression *J. Antimicrob. Chemother.* **2012** 67, 559-568.

(10) K Schreiber, in: The Alkaloids, Vol 10, RHF Manske, Ed, Academic Press, New York 1968, p 1.

(11) Ripperger, H. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier, S. W., Ed.; Pergamon, 1998; Vol. 12, p 103.

(12) a) Cardenas, P.D.; Sonawane, P.D.; Heinig, U.; Bocobza, S.E.; Burdman, S.; Aharoni, A. The Bitter Side of the Nightshades: Genomics Drives Discovery in *Solanaceae* Steroidal Alkaloid Metabolism *Phytochemistry* **2015**, 113, 24-32.

b) Itkin, M.; Heinig, U.; Tzfadia, O.; Bhide, A.J.; Shinde, B.; Cardenas, P.D.; Bocobza, S.E.; Unger, T.; Malitsky, S.; Finkers, R.; Tikunov, Y.; Bovy, A.; Chikate, Y.; Singh, P.; Rogachev, I.; Beekwilder, J.; Giri, A.P.; Aharoni, A. Biosynthesis of Antinutritional Alkaloids in Solanaceous Crops is Mediated by Clustered Genes *Science* **2013** 341, 175-179.

(13) Haruyama, H.; Takayama, T.; Kinoshita, T.; Kondo, M.; Nakajima, M.; Haneishi, T. Structural Elucidation and Solution Conformation of the Novel Herbicide Hydantocidin *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* **1991**, 1637–1640.

(14) Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K.J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus Edulis* *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, 120, 9967–9968.

(15) Roman, Y.; Alfonso, A.; Louzao, M.C.; Rosa, L.A.; Leira, F.; Vieites, J.M.; Vieytes, M.R.; Ofuji, K.; Satake, M.; Yasumoto, T.; Botana, L.M. Azaspiracid-1, a Potent Nonapoptotic New Phycotoxin with Several Cell Targets *Cell. Signalling* **2002**, 14, 703–716.

- (16) Sanglier, J.J.; Quesniaux, V.; Fehr, T.; Hofmann, H.; Mahnke, M.; Memmert, K.; Schuler, W.; Zenke, G.; Gschwind, L.; Maurer, C.; Schilling, W. Sanglifehrins A, B, C and D, Novel Cyclophilin-Binding Compounds Isolated from *Streptomyces* sp A92-308118. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activity *J. Antibiot. (Tokyo)* **1999**, 52, 466-473.
- (17) Czajkowska-Szczykowska, D.; Diaz, A.C.; Aleksiejczuk, G.; Castro, Y.L.; Morzycki, J.W. Access to 27-Nortomatidine and 27-Norsoladulcidine Derivative *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 4104-4111.
- (18) Wang, S.-S.; Shi, Y.; Tian, W.S. Highly Efficient and Scalable Synthesis of Clionamide D *Org. Lett.* **2014**, 16, 2177-2179.
- (19) Hu, Z.X.; Cheng, S.-G. The Technological Research of Diosgenin Extraction by Natural Fermentation Method *Adv. Mat. Res.* **2014**, 864, 490-494.
- (20) Ghoreishi, S.M.; Bataghva, E.; Dadkhah, A.A. Response Surface Optimisation of Essential Oil and Diosgenin Extraction from *Tribulus Terrestris* via Supercritical Fluid Technology *Chem. Eng. Technol.* **2012**, 35, 133-141.
- (21) Vandewalle, M.; Van der Eycken, J.; Oppolzer, W.; Vullioud, C. Iridoids : Enantioselective Synthesis of Loganin via an Asymetric Diers-Alder Reaction *Tetrahedron* **1986**, 42, 4035-4043.
- (22) Cooksey, P. Synthesis of a C1-C11 Fragment of Zincophorin Using Planar Chiral, Neutral π -Allyl Iron Complexes *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 5117-5126.
- (23) Li, J.; Ballmer, S.G.; Gillis, E.P.; Fujii, S.; Schmidt, M.J.; Palazzolo, A.M.; Lehmann, J.W.; Morehouse, G.F.; Burke, M.D. Synthesis of Many Different Types of Organic Small Molecules Using One Automated Process *Science* **2015**, 347, 1221-1226.
- (24) Brown, H.C.; Chen, J. Hydroboration with 9-Borabicyclo[3.3.1]nonane of Alkenes Containing Representative Functional Groups *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 3978-3988.
- (25) Prisbe, E.J.; Smejkal, J.; Verheyden, J.P.; Moffatt, J. G. Halo Sugar Nucleosides. V. Synthesis of Angustmycin A and Some Base Analogues *J. Org. Chem.* **1976**, 41, 1836-1846.
- (26) Najera, C.; Yus, M. Functionnalized Organolithium Compounds : New Synthetic Adventures *Curr. Org. Chem.* **2003**, 7, 867-926.
- (27) Kan, T.; Fukuyama, T. Ns Strategies: A Highly Versatile Synthetic Method for Amines *Chem. Commun.* 2004, 0, 353-359.
- (28) Jung, Y.-J.; Park, E.-S.; Lee, E.-S.; Yoon, C.-M. Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers Using a Catalytic Amount of Decaborane *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 791-792.

- (29) Raina, S.; Singh, V.K. DDQ as a Mild and Efficient Catalyst for Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers *Synth. Commun.* **1995**, 25, 2395-4000.
- (30) Maiti, G.; Roy, S.C. A Mild and Efficient Method for Selective Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers to Alcohols *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6038-6039.
- (31) Kessar, S.V.; Gupta, Y.P.; Mahajan, R.K.; Joshi, G.S.; Rampal, A.L. Synthetic Studies in Steroidal Sapogenins and Alkaloids V : Synthesis of Kryptogenin, Diosgenin and Yamogenin *Tetrahedron* **1968**, 24, 899-904.
- (32) Moriwaki, S.; Murakami, H.; Takahashi, N.; Uemura, T.; Taketani, K.; Hoshino, S.; Nobuaku, T.; Narukami, T.; Goto, T.; Kawada, T. Yamogenin in Fenugreek Inhibits Lipid Accumulation Through the Suppression of Gene Expression in Fatty Acid Synthesis in Hepatocytes *Biosci. Biotech. Biochem.* **2014**, 78, 1231-1236.
- (33) Bovicelli, P.; Lupatelli, P.; Fracassi, D. Sapogenins and dimethyldioxirane: A new entry to cholestanes functionalized at the side chain. *Tetrahedron Lett.* **1994**, 35, 935-938.
- (34) Fuchs, P.L.; Lee, J.S. Efficient Protocol for Ring Opening of Spiroketals Using Trifluoroacetyl Trifluoromethanesulfonate (TFAT) *Org. Lett.* **2003**, 5, 3619-3622.
- (35) Wu, J.-J.; Shi, Y.; Tian, W.-S. Facile Synthesis of Solasodine Based on a Mild Halogenation-Ring Opening Reaction of Spiroketals in Steroidal Sapogenins *Tetrahedron Lett.* **2015**, 56, 1215–1217.
- (36) Prakash, S.S.; Blair, I.A. Selective Deprotection of Silyl Ethers *Tetrahedron Lett.* **1989** 30, 19-22.
- (37) Zhang, G.-P.; Shen, S.-D.; Lei, M.; Hu, L.-H. A Facile and Efficient Method for the Synthesis of Solasodine from Diosgenin *Tetrahedron* **2011**, 67, 5894-5896.
- (38) Watson, S.C.; Eastham, J.F. Colored indicators for simple direct titration of magnesium and lithium reagents *J. Organometal. Chem.* **1967**, 9, 165-168.

Supporting Information

Gram-scale Synthesis of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Antibiotic Properties Against Persistent Forms of *Staphylococcus aureus*

Chad Normandin[†], François Malouin[‡] and Eric Marsault^{†*}

[†]*Institut de Pharmacologie de Sherbrooke, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1H 5N4, Canada*

[‡]*Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec J1K 2R1, Canada*

Table of contents

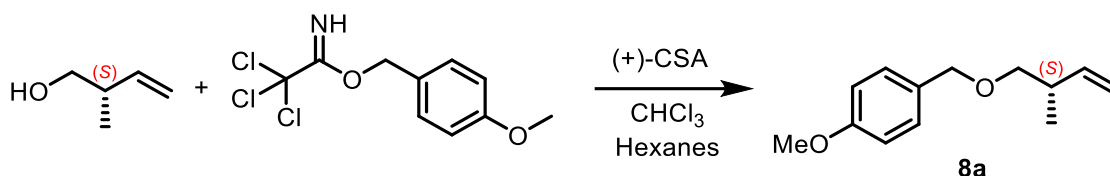
	Page
Table S1 Comparison of ¹³ C NMR data between synthetic and natural Tomatidine (1)	S3
Enantiomeric excess determination method for 8	S4
Table S4 Crystal data and structure refinement for 1	S6
Table S5 Crystal data and structure refinement for 16	S7
¹ H and ¹³ C NMR spectra of all new compounds	S8

Table S1 Comparison of ^{13}C NMR data from natural and synthetic Tomatidine (**1**)

Position	1 (Natural*)	1 (Synthetic)	Variance ($\Delta\delta$ ppm)
	^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃ , ppm)	^{13}C NMR (100 MHz, CDCl ₃ , ppm)	
1	37.11	37.11	0
2	31.65	31.65	0
3	71.42	71.43	0.01
4	38.35	38.35	0
5	44.99	44.99	0
6	28.71	28.72	0.01
7	32.45	32.45	0
8	35.20	35.20	0
9	54.57	54.57	0
10	35.73	35.73	0
11	21.23	21.24	0.01
12	40.37	40.37	0
13	41.03	41.03	0
14	55.92	55.92	0
15	32.83	32.83	0
16	78.67	78.67	0
17	62.13	62.13	0
18	17.10	17.11	0.01
19	12.51	12.51	0
20	43.18	43.18	0
21	16.03	16.03	0
22	99.18	99.20	0.02
23	26.78	26.78	0
24	28.74	28.75	0.01
25	31.22	31.23	0.01
26	50.39	50.39	0
27	19.49	19.50	0.01

*Commercial Tomatidine (Sigma-Aldrich #T2909, as freebase)

(S)-1-methoxy-4-(((2-methylbut-3-en-1-yl)oxy)methyl)benzene (**8a**)



To an aliquot of preparation of **8** (43 mg, 0.433 mmol) in hexanes (3 mL) and CHCl_3 (1 mL) was added 4-Methoxybenzyl-2,2,2-trichloroacetimidate (207 μL , 998 μmol , 2.0 eq). The yellow solution was cooled to 0°C before (+)-Camphorsulfonic Acid (11.6 mg, 49.9 μmol , 0.1 eq) was added. The ice bath was removed and the mixture was stirred at RT until the alcohol was fully consumed as indicated by TLC (2 h). The resulting suspension was then filtered through Celite then washed with hexanes several times. The filtrates were pooled and washed with sat. NaHCO_3 , water, brine, then dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0-10% EtOAc:Hex) afforded the PMB-protected alcohol **8a** (103 mg, 93%) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.27 (d, 2H, $J = 4.2$ Hz) 6.89 (d, 2H, $J = 4.2$ Hz) 5.81 (ddd, 1H, $J = 17.6$ Hz, 10.4 Hz, 6.8 Hz) 5.08 (dt, 1H, $J = 17.2$ Hz, 1.2 Hz) 5.02 (dt, 1H, $J = 10.4$ Hz, 1.2 Hz) 4.46 (s, 2H) 3.81 (s, 3H) 3.33 (ddd, 2H, $J = 32.0$ Hz, 9.2 Hz, 6.4 Hz) 2.50 (quint, 1H, $J = 6.8$ Hz) 1.04 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 159.41, 141.7, 130.9, 129.5, 114.1, 114.0, 75.1, 72.9, 55.6, 38.1, 16.9

FTIR-ATR (neat) ν (cm^{-1}) 2958, 2836, 1612, 1511, 1301, 1245, 1172, 1089, 1035, 913, 818, 755, 679

HRMS-ESI (m/z) calcd for $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_2$: 229.1199 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ found : 229.1195 $[\text{M}+\text{Na}]^+$

Optical rotation $[\alpha]_{\text{D}}$: -33.3° ($c = 1.0$) litt. : -30° ($c = 1.0$).

Chiral HPLC : **Chiralcel OD-H** 15cm x 4.6 mm column, dilution 1 mg / mL, Elution 100% hexanes, Injection volume 1 μL , Flow 1 mL / min, Temp 25°C , Detector @ 230 nm

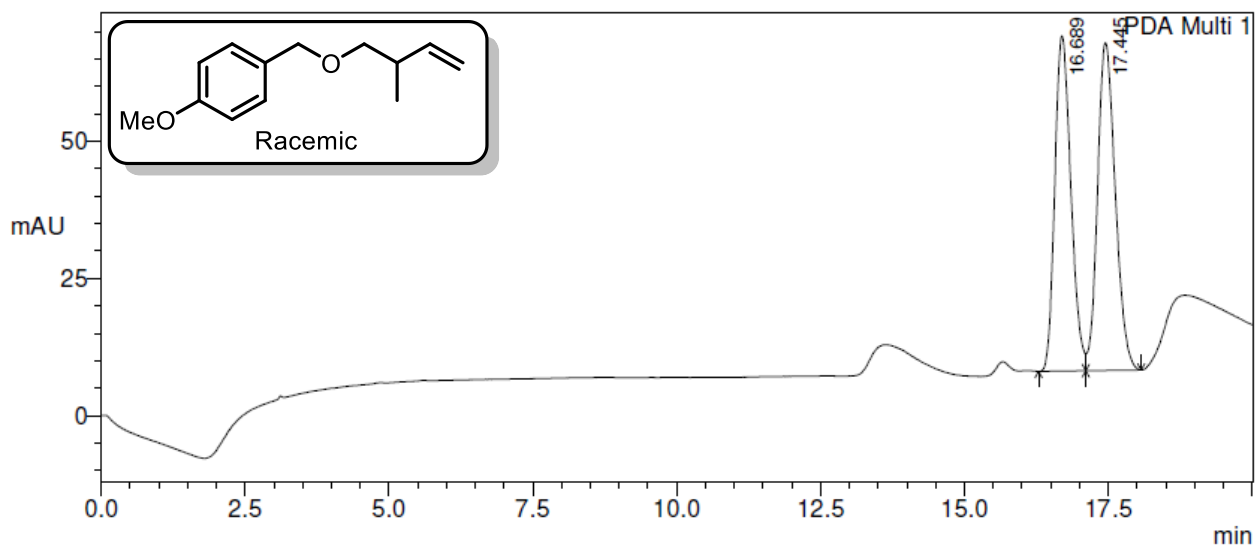


Figure S1 Chiral HPLC of racemic **8a**

Table S2 Peak area of racemic **8a** chromatogram

Peak	Time (min)	Area (%)	Compound
1	16.69	48.1	(<i>R</i>)-PMB Ether
2	17.45	51.9	(<i>S</i>)-PMB Ether

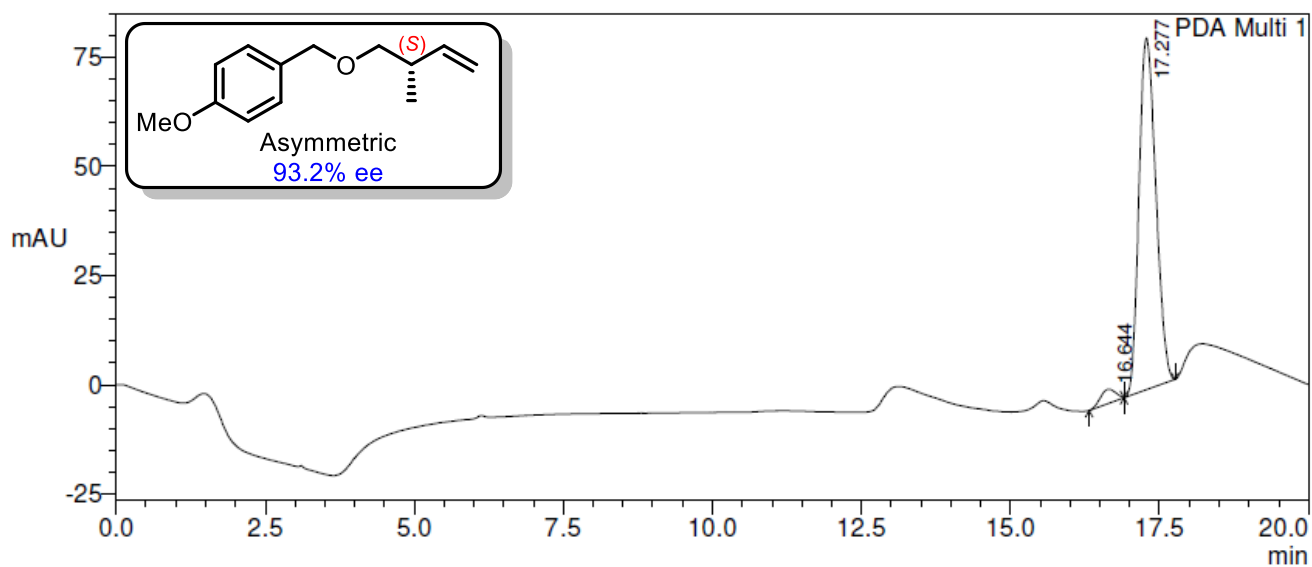


Figure S1 Chiral HPLC of asymmetric **8a**

Table S3 Peak area of the asymmetric **8a** chromatogram

Peak	Time (min)	Area (%)	Compound
1	16.65	3.6	(<i>R</i>)-PMB Ether
2	17.27	96.4	(<i>S</i>)-PMB Ether

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

Premièrement, nous avons imaginé la synthèse de la tomatidine directement via un stéroïde hexacyclique contenant tout les bons centres asymétriques requis, la yamogénine. Après beaucoup de temps et efforts d'optimisation à essayer de transformer ce produit directement au produit désiré, il a été découvert que le produit acheté commercialement n'était pas le produit annoncé par les fournisseurs. Cette erreur nous a coûté plusieurs mois de travail, qui ont néanmoins permis de mieux raffiner la stratégie de synthèse.

De retour à la case départ, nous avons développé une autre voie synthétique où nous avons assigné nous-même l'asymétrie requise du produit naturel via synthèse asymétrique. Nous avons aussi découvert un substrat très intéressant qui nous permettraient sans doute de construire notre propre cycle F du stéroïde désiré : la lactone bisnorcholanique. Cet intermédiaire, dérivé d'un stéroïde commercial très peu dispendieux, a apporté la majorité des atomes de carbones nécessaires au produit naturel et a aidé à la construction de ce dernier via son bon point d'encrage électrophile. L'alkylation de cette dernière a été réalisée via l'alkyllithium du synthon requis, car les réactions d'alkylation de Grignard de cette lactone n'ont pas été fructueuses. Un autre problème rencontré a été la déprotection de l'alcool du synthon inséré précédemment sur l'échafaudage stéroïdien. La déprotection du tétrahydropyranyl n'a pas livré l'alcool primaire attendu mais plutôt le spirocétal correspondant, conséquence de l'attaque de cet alcool sur l'hémicétal généré suite à l'alkylation. Nous avons essayé de remédier à ce problème en introduisant un aldéhyde sous forme d'acétal en chaîne latérale. Suite au démasquage de l'aldéhyde, une tentative de cyclisation en cascade par amination réductrice-cyclisation en 1 seule étape a échoué, donnant seulement un hémiaminal.

Nous avons ensuite essayé de traiter le spirocétal 'indésiré' dans les mêmes conditions d'ouverture de cycle et ω -halogénéation puis substitution subséquente par azoture. Les conditions de réduction de l'azoture en milieu légèrement acide ont permis la cyclisation de l'amine subséquente afin d'obtenir la tomatidine en produit majoritaire, ainsi que la solasodine en produit minoritaire. Ces résultats confirment que le groupement méthyl en position 25 était crucial à la diastéréosélectivité de la cyclisation.

En conclusion, nous avons réussi la première synthèse diastéréosélective de la Tomatidine, et ce sur échelle multigramme. Cette synthèse, autrement jamais accédée sauf étant un sous produit de la synthèse de la solasodine, va permettre l'accès à de grandes quantités de l'alcaloïde stéroïdien qui permettront le futur développement de la SAR des dérivés de la tomatidine contre sa cible biologique active, l'ATP synthase de *Staphylococcus aureus*. Dans ces efforts, les objectifs de haut rendement global (24.9%, 11 étapes, séquence linéaire la plus longue), utilisation de matériaux de départ peu coûteux (diosgénine, 0.05\$ / g) et de pouvoir amener la synthèse sur l'échelle du gramme ont tous été atteints.

Pour les perspectives futures, la génération de l'asymétrie via moyen autre que l'utilisation d'auxiliaire chiral sera nécessaire afin d'amener cette synthèse à une échelle supérieure. Une possibilité découverte à la fin de ma maîtrise nous a permis d'appréhender l'utilisation de l'enzyme PPL (*Porcine Pancreatic Lipase*) et du diméthyl 2-méthylsuccinate racémique **104** (Schéma 37) afin d'obtenir l'acide **105** et le diester indésiré **106**, permettant de créer le centre asymétrique nécessaire au méthyle en position 25 de l'alcaloïde.¹³⁶ Ensuite, cet acide carboxylique pourrait être chimiosélectivement réduit à l'alcool **107** à l'aide de BH_3 et transformé en l'iodure désiré **80** en quelques étapes.

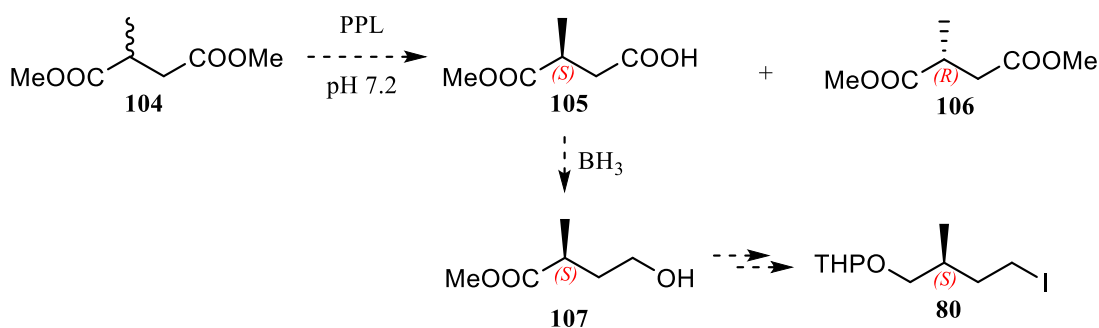


Schéma 37

La tomatidine est très un alcaloïde très prometteur dans le traitement des infections persistantes de *S. aureus* et beaucoup d'efforts seront nécessaires à l'amélioration de son profil afin d'obtenir une molécule active qui serait un bon traitement thérapeutique. Une source peu coûteuse de tomatidine est donc nécessaire à l'avancement de ce projet, où la synthèse de cette dernière pourras continuellement être améliorée.

RÉFÉRENCES ET NOTES

- ¹ <http://www.cvm.qc.ca/glaporte/vie.htm>, Données sur la vie, consulté le 20/01/2020
- ² Fracastorius, H. De contagione et contagiosis morbis et curatione, Libri III, Venice, Most Serene Republic of Venice, **1546**.
- ³ Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl. Klin. Wochenschr.* **1882**, 19, 287–296.
- ⁴ Austrian, R. The Gram stain and the etiology of lobar pneumonia, an historical note. *Bacteriol. Rev.* **1960**, 24, 261–265.
- ⁵ Tong, S.Y.; Davis, J.S.; Eichenberger, E.; Holland, T.L.; Fowler, V.G. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management *Clin. Microbiol. Rev.* **2015**, 28, 603–661.
- ⁶ Mo, Y.; Low, I.; Tambah, S.K.; Tambyah, P.A. The socio-economic impact of multidrug-resistant nosocomial infections: a qualitative study. *J. Hosp. Infect.* **2019**, 102, 454–460.
- ⁷ Stone P.W.; Braccia, D.; Larson, E. Systematic review of economic analyses of health care-associated infections, *Am. J. Infect. Control* **2005**, 33, 501–509.
- ⁸ Ogston, A. Ueber Abscesse. *Arch. Klin. Chir.* **1880**, 25, 588–600.
- ⁹ Ogston A. Report upon micro-organisms in surgical diseases *Brit. Med. J.* **1881**, 1, 369– 375.
- ¹⁰ Keyes, K.; Lee, M.D.; Maurer, J.J. Antibiotics: mode of action, mechanisms of resistance and transfer. In: Torrance ME, Isaacson RE, eds. Microbial Food Safety in Animal Agriculture Current Topics. Ames, IA, USA: Iowa State Press, **2003**, 45–56
- ¹¹ Porter, R. The Greatest Benefit to Mankind. Waukegan, IL, USA: Fontana Press, **1999**.
- ¹² Wallenfels, K. Symbiose und antibiose. *Angew. Chem.* **1945**, 58, 1–16.
- ¹³ Korzybski, T.; Kowszyk-Gindifer, Z.; Kurylowicz, W. Antibiotics: origin, nature and properties, Elsevier, 2013 ISBN : 9781483223049
- ¹⁴ Williams, K. The introduction of ‘chemotherapy’ using arsphenamine—the first magic bullet. *J. R. Soc. Med.* **2009**, 102, 343–348.
- ¹⁵ Lloyd, N.C.; Morgan, H.W.; Nicholson, B.K.; Ronimus, R.S. The composition of Ehrlich's Salvarsan: resolution of a century-old debate. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, 44, 941–944.
- ¹⁶ a) Weigert, C. Ueber Bacterien in der Pockenhaut. *Centralbl. F D Med. Wissenschaft. Berlin* **1871**, 9, 609–611. b) Weigert, C. Über eine Mykose bei einem neugeborenen Kinde. *Jahresb. D. Schles. Gesellsch. F. Vaterl. Cultur* **1876**, 53, 229–230.

-
- ¹⁷ Domagk, G. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **1935**, 61, 250–253.
- ¹⁸ Tréfouël, J.; Tréfouël, T.; Nitti, F.; Bovet, D. Activité du p-aminophénylesulfamide sur l'infection streptococcique expérimentale de la souris et du lapin. *C. R. Séances Soc. Biol. Ses Fil.* **1935**, 120, 756–758.
- ¹⁹ Rice, L.B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: No ESKAPE. *J. Infect. Dis.* **2008**, 197, 1079–1081.
- ²⁰ Martinez, J.L. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proc. Biol. Science* **2009**, 276, 2521–2530,
- ²¹ Hubick, S.; Jayaraman, A.; McKeen, A.; Reid, S.; Alcorn, J.; Stavrinides, J.; Sterenberg, B.T. A potent synthetic inorganic antibiotic with activity against drug-resistant pathogens. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 41999.
- ²² Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, 10, 226–236.
- ²³ Hodgkin, D.C. The X-ray analysis of the structure of penicillin. *Adv. Sci.* **1949**, 6, 85–89.
- ²⁴ Sheehan, J.C.; Henery-Logan, K.R. The total synthesis of penicillin V. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, 81, 3089–3094.
- ²⁵ Jørgensen, H.; Nielsen, J.; Villadsen, J. Analysis of penicillin V biosynthesis during fed-batch cultivations with high-yielding strain of *Penicillium chrysogenum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1995**, 43, 123–130
- ²⁶ Hubschwerlen, C.; Comprehensive Medicinal Chemistry II, **2007**, section 7.17.2.2 : Mode of Action of β -lactam antibiotics
- ²⁷ Schatz, A.; Bugle, E.; Waksman, S.A. Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Exp. Biol. Med.* **1944**, 55, 66–69.
- ²⁸ Schatz, A.; Waksman, S.A. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Exp. Biol. Med.* **1944**, 57, 244–248.
- ²⁹ Neidle, S.; Rogers, D.; Hursthouse, M.B. The crystal and molecular structure of streptomycin oxime selenate. *Tetrahedron Lett.* **1968**, 9, 4725–4728.

-
- ³⁰ a) Umezawa, S.; Tsuchiya, T.; Yamasaki, T.; Sano, H.; Takahashi, Y. Total synthesis of dihydrostreptomycin *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, 96, 920-921. b) Umezawa, S.; Takahashi, Y.; Usui, T.; Tsuchiya, T. Total synthesis of streptomycin. *J. Antibiot.* **1974**, 27, 997-999.
- ³¹ Distler, J.; Mansori, K.; Mayer, G.; Stockmann, M.; Piepersberg, W. Streptomycin biosynthesis and its regulation in Streptomyces *Gene* **1992**, 115, 105-111.
- ³² Demirci, H.; Murphy 4th, F.; Murphy, E.; Gregory, S.T.; Dahlberg, A.E.; Jogl, G. A structural basis for streptomycin-induced misreading of the genetic code. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 1355.
- ³³ Sefton AM. Mechanisms of antimicrobial resistance, *Drugs* **2002**, 62, 557-566.
- ³⁴ Tenover, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med.* **2006**, 119, 3-10.
- ³⁵ Wilson, D.N.; Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, 12, 35-48.
- ³⁶ Ramirez, M.S.; Tolmasky, M.E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist. Updat.* **2010**, 13, 151-171.
- ³⁷ Abraham, E.P.; Chain, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **1940**, 146, 837.
- ³⁸ D'Costa, V.M.; King, C.E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.W.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R.; Golding, G.B.; Poinar, H.N.; Wright, G.D.; Antibiotic resistance is ancient *Nature* **2011**, 477, 457-461.
- ³⁹ Bush, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2013**, 1277, 84-90.
- ⁴⁰ Pagès, J.M.; James, C.E.; Winterhalter, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, 6, 893-903.
- ⁴¹ McMurry, L.M.; Petrucci, R.E. Jr.; Levy, S.B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in Escherichia coli. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1980**, 77, 3974-3977.
- ⁴² Poole, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* **2005**, 56, 20-51.
- ⁴³ Visalli, M.A.; Murphy, E.; Projan, S.J.; Bradford, P.A. AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in Proteus mirabilis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 665-669.
- ⁴⁴ Connell, S.R.; Tracz, D.M.; Nierhaus, K.H.; Taylor, D.E. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, 47, 3675-3781.

-
- ⁴⁵ Ross, J.I.; Eady, E.A.; Cove, J.H.; Cunliffe, W.J.; Baumberg, S.; Wootton, J.C. Inducible erythromycin resistance in staphylococci is encoded by a member of the ATP-binding transport supergene family. *Mol. Microbiol.* **1990**, *4*, 1207–1214.
- ⁴⁶ Dönhöfer, A.; Franckenberg, S.; Wickles, S.; Berninghausen, O.; Beckmann, R.; Wilson, D.N. Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 16900–16905.
- ⁴⁷ Aldred, K.J.; Kerns, R.J.; Osheroff, N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* **2014**, *53*, 1565–1574.
- ⁴⁸ Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* **2002**, *15*, 482–492.
- ⁴⁹ Brandta, C.; Makarewicz, O.; Fischer, T.; Steina, C.; Pfeifer, Y.; Werner, G.; Pletz, M.W. The bigger picture: The history of antibiotics and antimicrobial resistance displayed by scientometric data. *Int. Journal Antimicrob. Agents.* **2014**, *44*, 424–430.
- ⁵⁰ Summers, A.O. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem *Anim. Biotechnol.* **2006**, *17*, 125–135
- ⁵¹ Chambers, H.F.; Deleo, F.R. Waves of resistance: Staphylococcus aureus in the antibiotic era, *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 629–641
- ⁵² Stapleton, P.D.; Taylor, P.W. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus, *Sci. Prog.* **2002**, *85*, 57–72
- ⁵³ McGuinness, W.A.; Malachowa, N.; DeLeo, F.R. Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus *Yale J. Biol. Med.* **2017**, *90*, 269–281.
- ⁵⁴ Miyaue, S.; Suzuki, E.; Komiyama, Y.; Kondo Y.; Morikawa, M.; Maeda, S. Bacterial Memory of Persisters: Bacterial Persister Cells Can Retain Their Phenotype for Days or Weeks After Withdrawal From Colony-Biofilm Culture *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1396.
- ⁵⁵ Conlon, B.P.; Rowe, S.E.; Lewis, K. Persister cells in biofilm associated infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2015**, *831*, 1–9.
- ⁵⁶ Moisan, H.; Brouillette, E.; Jacob, C.L.; Langlois-Begin, P.; Michaud, S.; Malouin, F. Transcription of virulence factors in *Staphylococcus aureus* small colony variants isolated from cystic fibrosis patients is influenced by SigB. *J. Bacteriol.* **2006**, *188*, 64–76.
- ⁵⁷ Flemming, H.C.; Wingender, J. The biofilm matrix *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, 623–633.

-
- ⁵⁸ Wolter, D.J.; Emerson, J.C.; McNamara, S.; Buccat, A.M.; Qin, X.; Cochrane, E.; Houston, L.S.; Rogers, G.B.; Marsh, P.; Prehar, K.; Pope, C.E.; Blackledge, M.; Deziel, E.; Bruce, K.D.; Ramsey, B.W.; Gibson, R.L.; Burns, J.L.; Hoffman, L.R. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin. Infect. Dis.* **2013**, *57*, 384–391.
- ⁵⁹ Proctor, R.A.; von Eiff, C.; Kahl, B.C.; Becker, K.; McNamara, P.; Herrmann, M.; Peters, G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. *Nat. Rev. Microbiol.* **2006**, *4*, 295–305.
- ⁶⁰ Vinh, D.C.; Embil, J.M. Device-related infections: a review *J. Long-Term Eff. Med. Implants* **2005**, *15*, 467–488
- ⁶¹ Petri, J.; Shimaki, Y.; Jiao, W.; Bridges, H.R.; Russell, E.R.; Parker, E.J.; Aragão, D.; Cook, G.M.; Nakatani, Y. Structure of the NDH-2 – HQNO inhibited complex provides molecular insight into quinone-binding site inhibitors *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2018**, *1859*, 482–490
- ⁶² Mitchell, G.; Seguin, D. L.; Asselin, A. E.; Deziel, E.; Cantin, A. M.; Frost, E. H.; Michaud, S.; Malouin, F., *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiol.* **2010**, *10*, 33.
- ⁶³ Schreiber, K. *The Alkaloids*, RHF Manske, Ed, Academic Press, New York **1968**, Vol 10, p 1.
- ⁶⁴ Ripperger, H. In *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*; Pelletier, S. W., Ed.; Pergamon, **1998**, Vol. 12, p 103.
- ⁶⁵ Fontaine, T. D.; Irving, G. W., Jr. Isolation and partial characterization of crystalline tomatine, an antibiotic agent from the tomato plant. *Arch. Biochem.* **1948**, *18*, 467-475.
- ⁶⁶ Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L. *Biochemistry*. 5th edition. New York: W H Freeman **2002**. Section 26.2, Cholesterol Is Synthesized from Acetyl Coenzyme A in Three Stages
- ⁶⁷ Ohyama, K.; Suzuki, M.; Kikuchi, J.; Saito, K.; Muranaka, T. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 725–730.
- ⁶⁸ Cardenas, P.D.; Sonawane, P.D.; Pollier, J.; Vanden-Bossche, R.; Dewangan, V.; Weithorn, E.; Tal, L.; Meir, S.; Rogachev, I.; Malitsky, S.; Giri, A.P.; Goossens, A.; Burdman, S.; Aharoni, A. GAME9

regulates the biosynthesis of steroidal alkaloids and upstream isoprenoids in the plant mevalonate pathway. *Nat. Commun.* **2016**, 15, 10654.

⁶⁹ Rocchetti, F.; Russo, G. Stereochemistry of the hydrogen introduction at C-25 in the biosynthesis of tomatidine. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1974**, 785–786.

⁷⁰ Tschesche, R.; Goossens, B.; Topfer, A. Zur einfuehrung des stickstoffs und zum gemeinsamen vorkommen von 25(R)- und 25(S)-steroidalkaloiden in solanaceen *Phytochemistry* **1976**, 15, 1387–1389.

⁷¹ McCue, K.F.; Allen, P.V.; Shepherd, L.V.; Blake, A.; Whitworth, J.; Maccree, M.M.; Rockhold, D.R.; Stewart, D.; Davies, H.V.; Belknap, W.R. The primary in vivo steroidal alkaloid glucosyltransferase from potato. *Phytochemistry*. **2006**, 67, 1590–1597.

⁷² Itkin, M.; Rogachev, I.; Alkan, N.; Rosenberg, T.; Malitsky, S.; Masini, L.; Meir, S.; Ijjima, Y.; Aoki, K.; de Vos, R.; Prusky, D.; Burdman, S.; Beekwilder, J.; Aharoni, A. GLYCOALKALOID METABOLISM1 is required for steroidal alkaloid glycosylation and prevention of phytotoxicity in tomato. *Plant Cell* **2011**, 23, 4507–4525.

⁷³ McCue, K.F.; Allen, P.V.; Shepherd, L.V.; Blake, A.; Maccree, M.M.; Rockhold, D.R.; Novy, R.G.; Stewart, D.; Davies, H.V.; Belknap, W.R. Potato glycosterol rhamnosyltransferase, the terminal step in triose side-chain biosynthesis. *Phytochemistry* **2007**, 68, 327–334.

⁷⁴ Zimowski, J. Specificity and properties of UDP-galactose : Tomatidine galactosyltransferase from tomato leaves. *Plant Science* **1998**, 136, 139–148.

⁷⁵ Cardenas, P.D.; Sonawane, P.D.; Heinig, U.; Bocobza, S.E.; Burdman, S.; Aharoni, A. The Bitter Side of the Nightshades: Genomics Drives Discovery in *Solanaceae* Steroidal Alkaloid Metabolism *Phytochemistry* **2015**, 113, 24–32.

⁷⁶ Itkin, M.; Heinig, U.; Tzfadia, O.; Bhide, A.J.; Shinde, B.; Cardenas, P.D.; Bocobza, S.E.; Unger, T.; Malitsky, S.; Finkers, R.; Tikunov, Y.; Bovy, A.; Chikate, Y.; Singh, P.; Rogachev, I.; Beekwilder, J.; Giri, A.P.; Aharoni, A. Biosynthesis of Antinutritional Alkaloids in Solanaceous Crops is Mediated by Clustered Genes *Science* **2013**, 341, 175–179.

⁷⁷ Milner, S.E.; Brunton, N.P.; Jones, P.W.; O'Brien, N.M.; Collins, S.G.; Maguire, A.R. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 3454–3484.

-
- ⁷⁸ Roddick, J.G. Steroidal glycoalkaloids: nature and consequences of bioactivity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1996**, 404, 277–295.
- ⁷⁹ Thangaraj, P. Anti-nutritional factors. *Prog. Drug. Res* **2016**, 71, 43-47.
- ⁸⁰ Friedman, M.; Levin, C. E.; Lee, S. U.; Kim, H. J.; Lee, I. S.; Byun, J. O.; Kozukue, N., Tomatine-containing green tomato extracts inhibit growth of human breast, colon, liver, and stomach cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, 57, 5727-5733.
- ⁸¹ Yan, K. H.; Lee, L. M.; Yan, S. H.; Huang, H. C.; Li, C. C.; Lin, H. T.; Chen, P. S., Tomatidine inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cell A549 by reducing matrix metalloproteinases expression. *Chem. Biol. Interact.* **2013**, 203, 580-587.
- ⁸² Boulet, M.L.; Isabelle, C.; Guay, I.; Brouillette, E.; Langlois, J.-P.; Jacques, P.-E.; Rodrigue, S.; Brzezinski, R.; Beauregard, P.B.; Bouarab, K.; Boyapelly, K.; Boudreault, P.-L.; Marsault, E.; Malouin, F. Tomatidine is a Lead Antibiotic Molecule that Targets *Staphylococcus Aureus* ATP synthase Subunit C. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, 62, e02197-2217.
- ⁸³ Mitchell, G.; Gattuso, M.; Grondin, G.; Marsault, E.; Bouarab, K.; Malouin, F. Tomatidine Inhibits Replication of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, 55, 1937–1945.
- ⁸⁴ Chagnon, F.; Guay, I.; Bonin, M.-A.; Mitchell, G.; Bouarab, K.; Malouin, F.; Marsault, E. Unraveling the Structure-Activity Relationship of Tomatidine, a Steroid Alkaloid with Unique Antibiotic Properties Against Persistent Forms of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 80, 605-620.
- ⁸⁵ Mahajan, R. Bedaquiline: first FDA-approved tuberculosis drug in 40 years. *Int. J. Appl. Basic Med. Res.* **2013**, 3, 1–2.
- ⁸⁶ Laluces, H.M.; Nakayama, A.; Nonato, M.G.; dela Cruz, T.E.; Tan, M.A.; Antimicrobial alkaloids from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* *J. Appl. Pharm. Sci.* **2015**, 5, 151-153
- ⁸⁷ Nonato, M.G.; Garson, M.J.; Truscott, R.; Carver, J.A. Structural characterization of piperidine alkaloids from *Pandanus amaryllifolius* by inverse-detected 2D NMR techniques *Phytochemistry* **1993**, 34, 1159- 1163.
- ⁸⁸ Seah, K.Y.; Macnaughton, S.J.; Dallimore, J.W.; Robertson, J. Synthesis of Pandamarilactone-1 *Org. Lett.* **2014**, 16, 884–887.
- ⁸⁹ Waters, A. Winter toxicity of unknown aetiology in mussels. *Harmful Algae News* **1996**, 14, 2.

-
- ⁹⁰ Satake, M.; Ofuji, K.; Naoki, H.; James, K.J.; Furey, A.; McMahon, T.; Silke, J.; Yasumoto, T. Azaspiracid, a New Marine Toxin Having Unique Spiro Ring Assemblies, Isolated from Irish Mussels, *Mytilus edulis*. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 9967–9968.
- ⁹¹ (a) Nicolaou, K.C.; Vyskocil, S.; Koftis, T.V.; Yamada, Y.M.A.; Ling, T.T.; Chen, D.Y.K.; Tang, W. J.; Petrovic, G.; Frederick, M.O.; Li, Y.W.; Satake, M. Structural Revision and Total Synthesis of Azaspiracid-1, Part 1: Intelligence Gathering and Tentative Proposal. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4312–4318. (b) Nicolaou, K.C.; Koftis, T.V.; Vyskocil, S.; Petrovic, G.; Ling, T.T.; Yamada, Y.M.A.; Tang, W.J.; Frederick, M.O. Structural Revision and Total synthesis of Azaspiracid-1, Part 2: Definition of the ABCD Domain and Total Synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4318–4324. (c) Nicolaou, K.C.; Koftis, T.V.; Vyskocil, S.; Petrovic, G.; Tang, W.J.; Frederick, M.O.; Chen, D.Y.K.; Li, Y.W.; Ling, T.T.; Yamada, Y.M.A. Total Synthesis and Structural Elucidation of Azaspiracid-1. Final Assignment and Total Synthesis of the Correct Structure of Azaspiracid-1. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 2859–2872.
- ⁹² Furey, A.; Moroney, C.; Magdalena, A.B.; Saez, M.J.F.; Lehane, M.; James, K.J. Geographical, temporal and species variation of the polyether toxins Azaspiracids in shellfish. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3078–3084
- ⁹³ Evans, D.A.; Kværnø, L.; Dunn, T.B.; Beauchemin, A.; Raymer, B.; Mulder, J.A.; Olhava, E.J.; Juhl, M.; Kagechika, K.; Favor, D.A. Total synthesis of (+)-Azaspiracid-1. An Exhibition of the Intricacies of Complex Molecule Synthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 16295–16309.
- ⁹⁴ Oikawa, M.; Uehara, T.; Iwayama, T.; Sasaki, M. Synthetic Study of Azaspiracid-1 : Synthesis of the EFGHI-Ring Fragment. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 3943–3946.
- ⁹⁵ Forsyth, C.J.; Hao, J.; Aiguade, J. Synthesis of the (+)-C26-C40 Domain of the Azaspiracids by a Novel Double Intramolecular Hetero-Michael Addition Strategy. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2001**, *40*, 3663–3667.
- ⁹⁶ Synthesis of the Southern FGHI Ring System of Azaspiracid-1 and Investigation into the Controlling Elements of the C28- and C36- Ketalization. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 7622–7626.
- ⁹⁷ Boonlarppadab, C.; Kauffman, C.A.; Jensen, P.R.; Fenical, W. Marineosins A and B, Cytotoxic spiroaminals from a Marine-Derived Actinomycete. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 5505–5508.

-
- ⁹⁸ Feng, Z.; Allred, T.K.; Hurlow, E.E.; Harran, P.G. Anomalous Chromophore Disruption Enables an Eight-Step Synthesis and Stereochemical Reassignment of (+)-Marineosin. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, *141*, 2274–2278.
- ⁹⁹ Cai, X.-C.; Wu, X.; Snider, B.B. Synthesis of the Spiroiminal Moiety of Marineosins A and B *Org. Lett.* **2010**, *12*, 1600-1603.
- ¹⁰⁰ Aldrich, L.N.; Berry, C.B.; Bates, B.S.; Konkol, L.C.; So, M.; Lindsley, C.W. Towards the Total Synthesis of Marineosin A : Construction of the Macrocyclic pyrrole and an Advanced, Functionnalized Spiroaminal Model. *Eur. J. Org. Chem.* **2013**, 4215–4218.
- ¹⁰¹ Xu, B.; Li, G.; Li, J.; Shi, Y. Total Synthesis of the Proposed Structure of Marineosin A. *Org. Lett.* **2016**, *18*, 2028–2031.
- ¹⁰² Grammatikopoulou, M.; Thysiadis, S.; Sarli, V. Gold-catalyzed spiro-*N,O*-ketal synthesis. *Org. Biomol. Chem.* **2015**, *13*, 1169-1178.
- ¹⁰³ Somaiah, R.; Ravindar, K.; Cencic, R.; Pelletier, J.; Deslongchamps, P. Synthesis of the Antiproliferative Agent Hippuristanol and Its Analogues from Hydrocortisone via Hg(II)-Catalyzed Spiroketalization : Structure-Activity Relationship. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 2511–2523.
- ¹⁰⁴ Wanyonyi, A.W.; Chhabra, S.C.; Mkoji, G.; Eilert, U.; Njue, W.M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aceleastrum*. *Phytochemistry* **2002**, *59*, 79-84.
- ¹⁰⁵ Kuo, K.W.; Hsu, S.H.; Li, Y.P.; Lin, W.L.; Liu, L.F.; Chang, L.C.; Lin, C.C.; Lin, C.N.; Sheu, H.M. Anticancer activity evaluation of the solanum glycoalkaloid solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1865-1873.
- ¹⁰⁶ Liu, L.F.; Liang, C.H.; Shiu, L.Y.; Lin, W.L.; Lin, C.C.; Kuo, K.W. Action of solamargine on human lung cancer cells – Enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. *FEBS Lett.* **2004**, *577*, 67-74
- ¹⁰⁷ Zhang, G.-P.; Shen, S.-D.; Lei, M.; Hu, L.-H. A facile and efficient method for the synthesis of solasodine from diosgenin. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 5894-5896.
- ¹⁰⁸ Wei, G.; Wang, J.; Du, Y. Total synthesis of solamargine. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2930–2933.
- ¹⁰⁹ Wu, J.-J.; Gao, R.; Shi, Y.; Tian, W.-S. Direction amination of the EF spiroketal in steroidal sapogenins: an efficient synthetic strategy and method for related alkaloids. *Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 6639–6642.

-
- ¹¹⁰ Kamal, A.; Rao, N.V.; Laxman, E. Iodotrimethylsilane: A mild and efficient reagent for the reduction of azides to amines. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 6945-6948.
- ¹¹¹ a) Nakajima, M.; Itoi, K.; Takamatsu, Y.; Kinoshita, T.; Okazaki, T.; Kawakubo, K.; Shindo, M.; Honma, T.; Tohjigamori, M.; Haneishi, T. Hydantocidin: A new compound with herbicidal activity from *Streptomyces hygroscopicus*. *J. Antibiot.* **1991**, 44, 293–300 b) Hanessian, S.; Sancéau, J.-Y.; Chemla, P. Synthesis of surrogate structures related to the herbicidal agent hydantocidin. *Tetrahedron* **1995**, 51, 6669–6678.
- ¹¹² Fuentes, J.; Salameh, B.A.B.; Pradera, M.A.; Fernandez de Cordoba, F.J.; Gasch, C. Stereocontrolled synthesis of thiohydantoin spiro-nucleosides from sugar spiroacetals. *Tetrahedron* **2006**, 62, 97–111.
- ¹¹³ a) Mio, S.; Ueda, M.; Hamura, M.; Kitakawa, J.; Sugai, S. Synthetic studies on (+)-hydantocidin: Synthesis of stereoisomers of (+)-hydantocidin. *Tetrahedron* **1991**, 47, 2145–2154. b) Mio, S.; Kumagawa, Y.; Sugai, S. Synthetic studies on (+)-hydantocidin: A new synthetic method for construction of the spiro-hydantoin ring at the anomeric position of D-ribofuranose. *Tetrahedron* **1991**, 47, 2133–2144. c) Mio, S.; Shiraishi, M.; Sugai, S. Synthetic studies on (+)-hydantocidin: Aldol addition approaches towards the stereoisomers of (+)-hydantocidin. *Tetrahedron* **1991**, 47, 2121–2132.
- ¹¹⁴ Mio, S.; Sano, H.; Shindou, M.; Honma, T.; Sugai, S. Synthesis and Herbicidal Activity of Deoxy Derivatives of (+)-Hydantocidin *Agric. Biol. Chem.* **1991**, 55, 1105–1109.
- ¹¹⁵ Gregoriou, M.; Noble, M.E.M.; Watson, K.A.; Garman, E.F.; Krülle, T.M.; de la Fuente, C.; Fleet, G.W.J.; Oikonomakos, N.G.; Johnson, L.N. The structure of a glycogen phosphorylase glucopyranose spirohydantoin complex at 1.8 Å resolution and 100 K: The role of the water structure and its contribution to binding. *Protein Sci.* **1998**, 7, 915–927.
- ¹¹⁶ DeFronzo, R.A. The triumvirate: Cell, muscle, liver: A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* **1988**, 37, 667–687.
- ¹¹⁷ Kurti, L.; Czako, B, Strategic Applications of Named Reactions in Organic Synthesis, El Sevier Academic, New York, **2004**. p 208.
- ¹¹⁸ De Armas, P.; Francisco, C.G.; Hernandez, R.; Salazar, J.A.; Suarez, E. Steroidal *N*-nitroamines Part 4. Intramolecular functionalization of *N*-nitroamine radicals: synthesis of 1,4-nitroimine compounds. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I* **1988**, 3255-3265.

-
- ¹¹⁹ Dorta, R.L.; Francisco, C.G.; Suarez, E. Hypervalent organoiodine reagents in the transannular functionalization of medium-sized lactams: synthesis of 1-azabicyclo compounds. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1989**, 21, 1168-1169.
- ¹²⁰ Freire, R.; Martin, A.; Pérez-Martin, I.; Suarez, E. Synthesis of oxa-aza spirobicycles by intramolecular hydrogen abstraction promoted by *N*-radicals in carbohydrate systems. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 5113–5116.
- ¹²¹ Martin, A.; Pérez-Martin, I.; Suarez, E. Intramolecular Hydrogen Abstraction Promoted by Amidyl Radicals. Evidence for Electronic Factors in the Nucleophilic Cyclization of Ambident Amides to Oxocarbenium Ions. *Org. Lett.* **2005**, 7, 2027-2030.
- ¹²² Jung, M.E.; Piizzi, G. *Gem*-disubstituent Effect: Theoretical Basis and Synthetic Applications. *Chem. Rev.* **2005**, 105, 1735–1766.
- ¹²³ Djerassi, C.; Halpern, O.; Pettit, G.R.; Thomas, G.H. Reaction of the Steroidal Sapogenin Spiroketal System with Ethanedithiol. *J. Org. Chem.* **1959**, 24, 1-6.
- ¹²⁴ Mercaptolysis of the E/F Rings of Steroidal Sapogenins: A concise Synthesis of $\Delta^{20(22)}$ -Furostene-26-thioethers. *Chin. J. Chem.* **2003**, 21, 784-788.
- ¹²⁵ Wang, S.-S.; Shi, Y.; Tian, W.-S. Highly Efficient and Scalable Synthesis of Clonamide D. *Org. Lett.* **2014**, 16, 2177–2179.
- ¹²⁶ Cooksey, P. Synthesis of a C1-C11 Fragment of Zincophorin Using Planar Chiral, Neutral π -Allyl Iron Complexes. *Org. Biomol. Chem.* **2013**, 11, 5117-5126.
- ¹²⁷ Vandewalle, M.; Van der Eycken, J.; Oppolzer, W.; Vullioud, C. Iridoids : Enantioselective Synthesis of Loganin via an Asymmetric Diers-Alder Reaction. *Tetrahedron* **1986**, 42, 4035-4043.
- ¹²⁸ Lindler, F.; Friedrich, S.; Hahn, F. Total Synthesis of Complex Biosynthetic Late-Stage Intermediates and Bioconversion by a Tailoring Enzyme from Jerangolid Biosynthesis. *J. Org. Chem.* **2018**, 83, 14091–14101.
- ¹²⁹ Wunsch, S.; Breit, B. Probing *o*-Diphenylphosphanyl Benzoate (*o*-DPPB)-Directed C-C Bond Formation: Total Synthesis of Dictyostatin. *Chem. Eur. J.* **2015**, 21, 2358-2363.
- ¹³⁰ Li, J.; Ballmer, S.G.; Gillis, E.P.; Fujii, S.; Schmidt, M.J.; Palazzolo, A.M.; Lehmann, J.W.; Morehouse, G.F.; Burke, M.D. Synthesis of Many Different Types of Organic Small Molecules Using One Automated Process *Science* **2015**, 347, 1221-1226.

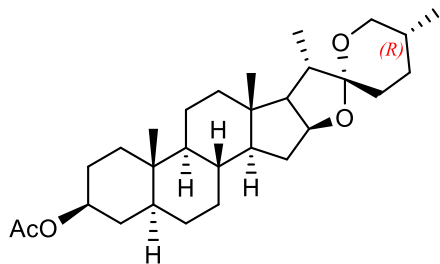
-
- ¹³¹ Czajkowska-Szczykowska, D.; Diaz, A.C.; Aleksiejczuk, G.; Castro, Y.L.; Morzycki, J.W. Access to 27-Nortomatidine and 27-Norsoladulcidine Derivative *J. Org. Chem.* **2019**, 84, 4104-4111
- ¹³² Jung, Y.-J.; Park, E.-S.; Lee, E.-S.; Yoon, C.-M. Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers Using a Catalytic Amount of Decaborane *Bull. Korean Chem. Soc.* **2002**, 23, 791-792.
- ¹³³ Raina, S.; Singh, V.K. DDQ as a Mild and Efficient Catalyst for Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers *Synth. Commun.* **1995**, 25, 2395-4000.
- ¹³⁴ Maiti, G.; Roy, S.C. A Mild and Efficient Method for Selective Deprotection of Tetrahydropyranyl Ethers to Alcohols *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 6038-6039.
- ¹³⁵ Zuo, Z.; Ma, D. Enantioselective Total Syntheses of Communesins A and B *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, 50, 12008 –12011.
- ¹³⁶ Salaun, J.; Karkour, B.; Ollivier, J. Optically active 2-vinylcyclobutanones. *Tetrahedron* **1989**, 45, 3151-3162.

ANNEXE 1 : PARTIE EXPÉRIMENTALE DES TRAVAUX PRÉSENTÉS

Unless otherwise stated, all reactions were performed in flame-dried or oven-dried glassware under an atmosphere of nitrogen using Teflon-coated stir bars. Reactions ran above room temperature (23 °C) were heated in an oil bath. Unless otherwise stated, commercially available reagents were purchased from Sigma-Aldrich with the highest available purity and used without purification. Tetrahydrofuran (THF), methanol (MeOH), acetonitrile (MeCN), *N,N*-dimethylformamide (DMF) were purchased as commercial DriSolv[®] solvent bottles, stored and used under argon atmosphere. Diethyl ether (Et₂O) and pentane were distilled over sodium under argon and kept dry using activated MS3Å. Flash chromatography was performed on Silicycle SiliaFlash P60 silica gel (230–400 mesh, 40–63 µm particle size). Automated flash chromatography was performed using a Biotage Isolera ISO-1SV automated flash chromatography system. Thin layer chromatography (TLC) was performed on glass-backed Silicycle SiliaPlate 250 µm thickness, 60 Å porosity F-254 precoated plates from Silicycle. Compounds were visualized with UV light (254 nm) and stained with cerium ammonium molybdate followed by heating (steroids) or potassium permanganate (KMnO₄) followed by heating (non-steroids). Nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were obtained on a Bruker Ascend 400 spectrometer. Residual chloroform (CHCl₃) signals were used as internal reference for ¹H (δ = 7.26 ppm) and ¹³C (δ = 77.1 ppm) spectra. The following abbreviations were used to describe NMR multiplicities: br = broad, s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, quint = quintet, sext = sextuplet, sept = septuplet and m = multiplet. Coupling constants (*J*) are given in Hertz (Hz). X-Ray diffraction was performed on a KAPPA APEX-DUO (Bruker) diffractometer device using a Cu radiation source.

Note: For the sake of simplicity, characterization of racemic molecules **75**, **76**, **77** and adduct **79** is not described since the asymmetric versions are fully characterized in the manuscript above and are all identical by NMR (¹H and ¹³C).

(3 β ,5 α ,25*R*)-Spirostan-3-ol acetate (55**)**

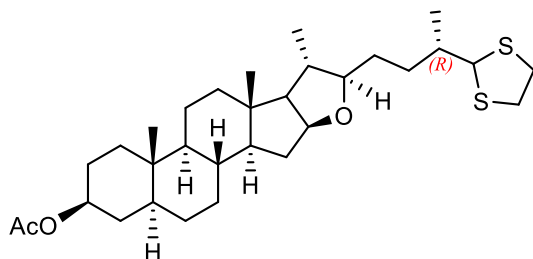


In a vessel previously flushed with Ar, commercial yamogenin (which was in fact diosgenin, as confirmed later in this synthesis by X-ray diffraction, see **Figure 21**) (12.0 g, 28.9 mmol, 1.0 eq) and a 2:1 EtOH/DCM mixture (150 mL) was added to a pressure vessel. This mixture was stirred vigorously until the suspension had dissolved, then 20% Pd(OH)₂/C (406 mg, 2.89 mmol, 0.10 eq) was added. The vessel was then closed tightly and vacuum was applied, followed by refilling with H₂ gas. This flushing procedure was repeated 3 times and the vessel was filled a final time with H₂ gas at 40psi. This mixture was stirred overnight, followed by vacuuming of the vessel. The mixture was then filtered on a Celite® pad, the latter washed multiple times with DCM and the filtrate was concentrated *in vacuo*. The resulting solid was dried thoroughly and then dissolved in pyridine (46.7 mL, 578 mmol, 20.0 eq). This mixture was stirred to 50°C before acetic anhydride (16.4 mL, 173 mmol, 6.0 eq) was added slowly. This mixture was stirred 2h at 50°C before it was poured into an ice-cold water bath. The reaction flask was then washed thoroughly with ice water and the suspension subsequently filtered on a buchner funnel for 15 minutes. After the resulting solid was then allowed to dry overnight to recover **55** (13.2 g, 100%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.67 (sept, 1H, J = 4.8 Hz) 4.38 (q, 1H, J = 7.6 Hz) 3.49-3.44 (m, 1H) 3.36 (t, 1H, J = 10.8 Hz) 2.01 (s, 3H) 0.95 (d, 3H, J = 6.8 Hz) 0.83 (s, 3H) 0.78 (d, 3H, J = 6.4 Hz) 0.75 (s, 3HJ)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8 (s), 109.4 (s), 80.9 (s), 77.4 (s), 73.8 (s), 66.9 (s), 62.3 (s), 56.4 (s), 54.3 (s), 44.8 (s), 41.8 (s), 40.7 (s), 40.1 (s), 36.8 (s), 35.7 (s), 35.2 (s), 34.1 (s), 32.3 (s), 31.9 (s), 31.5 (s), 30.4 (s), 28.9 (s), 28.6 (s), 27.6 (s), 21.6 (s), 21.1 (s), 17.3 (s), 16.6 (s), 14.6 (s), 12.4 (s).

(3 β -5 α ,25S)-26-Ethylenethioketalfurostan-3-ol acetate (60**)**

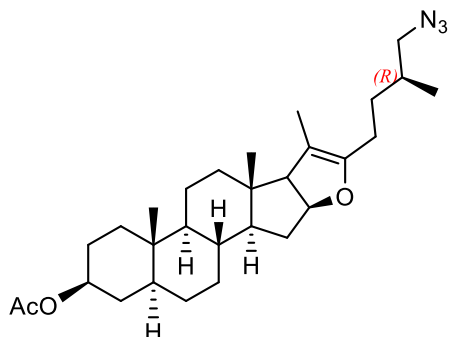


To a solution of **55** (50.0 mg, 109 μ mol, 1.0 eq.) in dry DCM (3 mL) was added Zn(OTf)₂ (79.2 mg, 218 μ mol, 2.0 eq.) and 1,2-ethanedithiol (91.4 μ L, 1.09 mmol, 10 eq.). The mixture was refluxed for 16h. This mixture was then cooled to RT then diluted with DCM (10 mL), washed with water (10 mL), washed with brine and dried on sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. The resulting mixture was purified by flash chromatography (0 to 10% EtOAc : hexanes) to yield **60** (42.3 mg, 72%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.66 (hept, 1H, J = 4.8 Hz) 4.51 (d, 1H, J = 6.4 Hz) 4.26 (dt, 1H, J = 10.4 Hz, 5.2 Hz) 3.30 (sext, 1H, J = 3.6 Hz) 3.23-3.11 (m, 4H) 2.00 (s, 3H) 1.04 (d, 3H, J = 6.4 Hz) 0.97 (d, 3H, J = 6.4 Hz) 0.82 (s, 3H) 0.76 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8 (s), 90.1 (d), 83.3 (s), 73.8 (s), 65.4 (s), 60.6 (d), 56.8 (s), 54.4 (s), 44.8 (s), 41.1 (s), 40.8 (s), 39.7 (s), 38.8 (d), 37.9 (s), 35.7 (s), 35.4 (s), 34.1 (s), 32.9 (s), 32.2 (d), 31.7 (s), 31.3 (s), 28.6 (s), 27.6 (s), 22.8 (s), 21.6 (s), 20.9 (s), 19.1 (s), 17.3 (s), 16.7 (s), 14.2 (s), 12.4 (s).

(4S,6aS,8aS,11aS)-10-((R)-4-azido-3-methylbutyl)-6a,8a,9-trimethyl-2,2a,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-hexadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-4-yl acetate (**64**)

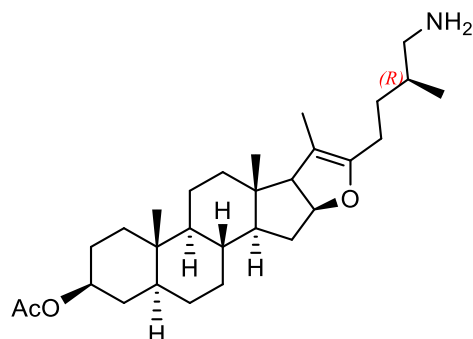


To a solution of **55** (230 mg, 501 μ mol, 1.0 eq.) and LiBr (435 mg, 5.01 mmol, 10 eq.) in ACN (2.00 mL) and DCM (4.00 mL) was added $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ (619 μ L, 5.01 mmol, 10 eq) under Ar atmosphere. The reaction was stirred vigorously for 4h and quenched with sat. NaHCO_3 , diluted with water, extracted with DCM. Combined organic layers were washed with brine, dried by sodium sulfate, concentrated *in vacuo*. The crude was then dissolved in DMF (2.00 mL) and stirred at 70°C for 2h, and then sodium azide (97.8 mg, 1.50 mmol, 3.0 eq.) was added and the mixture was stirred at 70°C for 3h. It was then cooled to RT, diluted with water (10 mL), extracted with DCM (3x 15 mL), the organic layer was washed with brine, dried on sodium sulfate, then concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (4 to 8% EtOAc : hexanes) afforded product (236 mg, 97%) as a white pasty solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 4.74-4.64 (m, 2H); 3.23 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, 5.6 Hz); 3.09 (dd, 1H, $J = 12.0$ Hz, 7.2 Hz); 2.45 (d, 1H, $J = 10.0$ Hz); 2.18-2.07 (m, 3H); 2.01 (s, 3H); 1.57 (s, 3H); 0.96 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz); 0.83 (s, 3H); 0.65 (s, 3H).

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 170.8 (s), 151.3 (s), 104.2 (s), 84.5 (s), 73.8 (s), 64.4, 57.8 (d), 54.9 (s), 54.3 (s), 44.8 (s), 43.7 (s), 39.8 (s), 36.9 (s), 35.7 (s), 35.0 (s), 34.1 (s), 33.2 (d), 32.5 (s), 31.6 (d), 28.6 (s), 27.6 (s), 23.3 (s), 21.6 (s), 21.3 (s), 17.7 (d), 14.3 (d), 12.4 (s), 11.8 (s).

(4S,6aS,8aS,11aS)-10-((R)-4-amino-3-methylbutyl)-6a,8a,9-trimethyl-2,2a,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-hexadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-4-yl acetate (64**)**

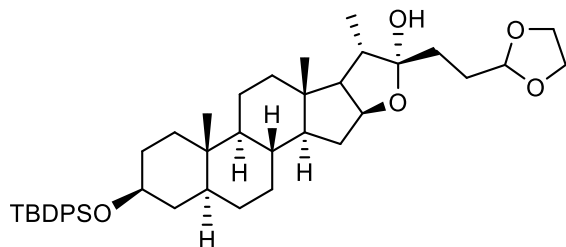


In a flask previously flushed with Ar, 10% Pd/C (55 mg, 51.7 μ mol, 0.05 eq) was added to a solution of azide **61** (500 mg, 103 mmol, 1.0 eq) dissolved in EtOAc (25 mL). The resulting solution was then flushed freely with H₂ gas for 5 minutes before it was capped and equipped with a H₂ gas balloon. This mixture was stirred 12h before the resulting suspension was then filtered on a celite pad and washed thoroughly with EtOH. The filtrate was then dried *in vacuo* and directly yielded amine **64** (401 mg, 85%) as a black pasty solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.75-4.64 (m, 2H) 3.42 (br s) 2.77-2.55 (m, 2H) 2.45 (d, 1H, *J* = 10.0 Hz) 2.18-2.07 (m, 2H) 2.01 (s, 3H) 1.57 (s, 3H) 0.97 (d, 3H, *J* = 10.0 Hz) 0.83 (s, 3H) 0.65 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 170.8 (s), 151.5 (s), 104.0 (s), 84.5 (s), 77.4 (s), 73.8 (s), 64.5 (s), 54.9 (s), 54.4 (s), 47.4 (d), 44.8 (s), 43.7 (s), 39.9 (s), 36.9 (s), 35.7 (s), 35.1 (s), 34.5 (s), 34.2 (s), 32.5 (s), 31.7 (d), 28.6 (s), 27.6 (s), 23.4 (s), 21.6 (s), 21.3 (s), 17.4 (d), 14.3 (d), 12.4 (s), 11.8 (s).

(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10R,11aS,12aS,12bR)-10-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-4-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyloctadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10-ol (96**)**

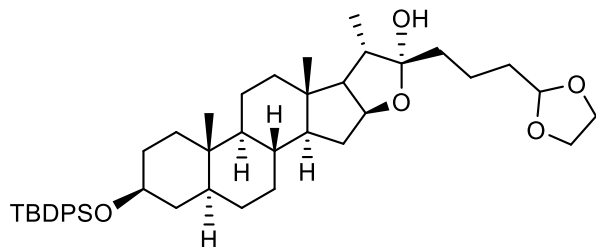


Using flame-dried apparatus and under inert atmosphere, freshly titrated *tert*-BuLi (1.70 M in Pentane, 2.42 mL, 4.11 mmol, 3.10 eq) was added dropwise to a mixture of **94** (453 mg, 1.99 mmol, 1.5 eq) in anhydrous Et₂O (9 mL) at -78°C. This mixture was stirred 45 min until a solution of **72** (775 mg, 1.32 mmol) in anhydrous THF (9 mL) was added dropwise. The mixture was slowly allowed to warm to 0°C over 3h. The mixture was quenched with sat. NH₄Cl (5 mL) then brine (10 mL). The resulting aqueous layer was extracted with Et₂O (3x 20 mL) and the combined organic layers were dried over sodium sulfate then concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0 to 50% EtOAc : hexanes) afforded hemiketal **96** (530 mg, 58%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.68-7.66 (m, 4H) 7.43-7.33 (m, 6H) 4.92-4.90 (m, 1H) 4.55 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz) 4.02-3.93 (m, 2H) 3.89-3.83 (m, 2H) 3.57 (sept, 1H, *J* = 5.2 Hz) 3.02 (s, 1H, *OH*) 1.04 (s, 9H) 1.00 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz) 0.80 (s, 3H) 0.74 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 135.8 (s), 134.9 (d), 129.4 (s), 127.5 (d), 110.3 (s), 104.5 (s), 81.3 (s), 72.8 (s), 64.9 (s), 62.9 (s), 60.4 (s), 56.3 (s), 54.3 (s), 44.8 (s), 40.9 (s), 39.9 (s), 39.7 (s), 38.9 (s), 38.4 (s), 37.0 (s), 35.5 (s), 35.1 (s), 34.0 (s), 32.3 (s), 31.2 (s), 27.1 (s), 25.4 (s), 21.0 (d), 19.2 (s), 18.4 (s), 16.5 (s), 15.6 (s), 14.3 (s), 12.4 (s).

(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10R,11aS,12aS,12bR)-10-(3-(1,3-dioxolan-2-yl)propyl)-4-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyloctadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10-ol (97)

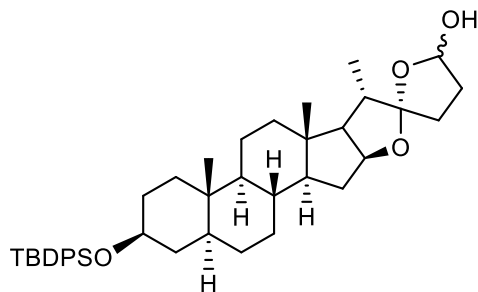


Using flame-dried apparatus and under inert atmosphere, freshly titrated *tert*-BuLi (1.70 M in Pentane, 8.77 mL, 10.3 mmol, 6.0 eq) was added to a mixture of **95** (1.24 g, 5.13 mmol, 3.0 eq) in anhydrous Et₂O (15 mL) at -78°C. This mixture was stirred 45 min at -78°C until a solution of **72** (1.00 g, 1.71 mmol) in anhydrous THF (10 mL) was cannulated into the mixture. The mixture was stirred 10 min at -78°C, after which mixture was quenched with sat. NH₄Cl (10 mL) and stirred 1 h while slowly warming back to RT. The resulting mixture was then added to water and was extracted with Et₂O (3x 25 mL). The combined organic layers were dried over sodium sulfate and concentrated *in vacuo*. Purification by flash chromatography (0 to 60% EtOAc : Hex) afforded hemiketal **97** (583 mg, 49%) as a white solid.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.68-7.66 (m, 4H) 7.43-7.34 (m, 6H) 4.86 (t, 1H, *J* = 4.4 Hz) 4.55 (q, 1H, *J* = 6.8 Hz) 3.97-3.94 (m, 1H) 3.88-3.82 (m, 2H) 3.57 (sept, 1H, *J* = 5.2 Hz) 1.62 (s, 1H, *OH*) 1.04 (s, 9H) 1.00 (d, 3H, *J* = 7.2 Hz) 0.80 (s, 3H) 0.72 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 135.9 (s), 134.9 (s), 129.4 (s), 127.5 (s), 110.3 (s), 104.5 (s), 81.3 (s), 72.8 (s), 64.9 (s), 62.9 (s), 56.3 (s), 54.3 (s), 44.8 (s), 41.0 (s), 39.9 (s), 39.8 (s), 38.9 (s), 38.4 (s), 37.0 (s), 35.5 (s), 35.1 (s), 34.0 (s), 32.3 (s), 31.8 (d), 28.6 (s), 27.1 (s), 25.4 (s), 21.0 (d), 19.2 (s), 18.4 (s), 16.5 (s), 15.6 (s), 14.3 (d), 12.4 (s).

(2S,2a'S,4'S,6a'S,6b'S,8a'S,9'S,11a'S,12a'S,12b'R)-4'-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a',8a',9'-trimethylicosahydro-3H-spiro[furan-2,10'-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan]-5-ol (98)



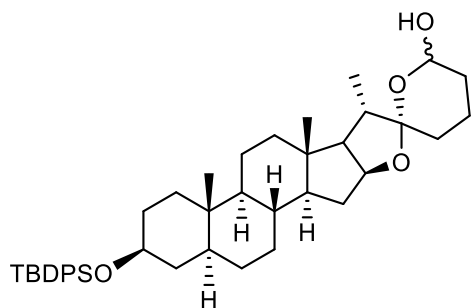
To a solution of **96** (203 mg, 295 μmol) in THF (10 mL) was added 5% HCl (4.06 mL, 6.68 mmol). This mixture was stirred at RT for 16h. Sat. NaHCO_3 (5 mL) was then added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 20 mL). The combined organic layers were dried with sodium sulfate then concentrated *in vacuo* to directly yield pure **98** (190 mg, 100%) as a white solid without purification.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) .67 (d, 4H, $J = 6.8$ Hz) 7.43-7.34 (m, 6H) 5.56 (s, 1H) 4.41 (q, 1H, $J = 7.2$ Hz) 3.57 (sept, 1H, $J = 5.2$ Hz) 2.36 (s, 1H, **OH**) 1.04 (s, 3H) 1.00 (d, 3H, $J = 7.2$ Hz) 0.80 (s, 3H) 0.75 (s, 3H)

^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 135.9 (s), 135.1 (d), 129.5 (s), 127.5 (d), 121.1 (s), 120.3 (s), 100.3 (s), 98.8 (s), 81.8 (s), 77.4 (s), 72.9 (s), 62.3 (s), 62.0 (s), 56.4 (d), 54.4 (d), 44.9 (s), 40.9 (d), 40.0 (d), 39.0 (s), 38.5 (d), 37.1 (s), 35.6 (s), 35.2 (d), 34.0 (s), 32.3 (d), 31.8 (s), 30.8 (s), 28.7 (s), 27.1 (s), 21.1 (s), 19.3 (s), 16.4 (d), 15.3 (s), 14.7 (s), 12.5 (s).

NOTE: for simplicity purposes, only the major diastereoisomer was characterized.

(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10S,11aS,12aS,12bR)-4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10,2'-pyran]-6'-ol (99**)**



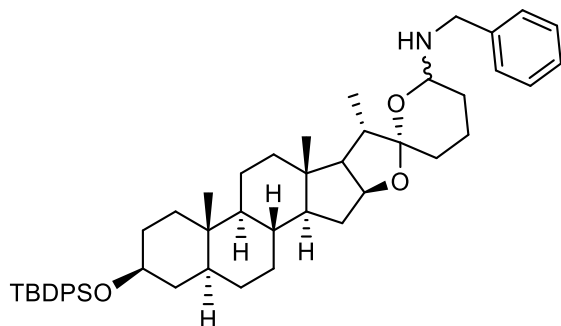
To a solution of hemiketal **97** (717 mg, 1.02 mmol, 1.0 eq) in THF (10 mL) was added 5% HCl (4.0 mL, 6.58 mmol, 6.44 eq). This mixture was stirred at RT for 16h. A solution of sat. aq. NaHCO₃ (5 mL) was then added and the mixture was extracted with EtOAc (3x 15 mL). The combined organic layers were dried on sodium sulfate and concentrated *in vacuo* to directly yield **99** (667 mg, 99%) as a white solid without any purification needed.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.67 (d, 4H, *J* = 6.8 Hz) 7.43-7.34 (m, 6H) 5.03 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz) 4.48 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz) 4.12 (q, 1H, *J* = 7.2 Hz) 3.61-3.54 (m, 1H) 2.05 (s, 1H, OH) 1.04 (s, 9H) 0.98 (d, 3H, *J* = 6.8 Hz) 0.80 (s, 3H) 0.73 (s, 3H)

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 135.6 (s), 134.8 (d), 129.2 (s), 127.2 (d), 112.0 (s), 111.6 (s), 94.0 (s), 91.4 (s), 81.7 (s), 81.1 (s), 72.6 (s), 61.9 (d), 60.2 (s), 56.1 (d), 54.1 (d), 44.5 (d), 42.6 (s), 41.6 (s), 40.5 (d), 39.7 (d), 38.2 (s), 36.8 (s), 35.3 (s), 34.8 (d), 32.7 (s), 32.0 (d), 31.5 (d), 31.1 (s), 30.9 (s), 30.0 (s), 28.4 (s), 26.8 (s), 20.8 (d), 18.9 (d), 16.2 (d), 14.3 (d), 14.0 (s), 13.7 (s), 12.2 (s).

NOTE: for simplicity purposes, only the major diastereoisomer was characterized.

(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10S,11aS,12aS,12bR)-N-benzyl-4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10,2'-pyran]-6'-amine (101)



To a solution of **99** (50.0 mg, 76.1 μmol , 1.0 eq.) in MeOH (3 mL) was added NaBH_3CN (46.3 mg, 761 μmol , 10 eq.) and BnNH_2 (83.1 μL , 761 μmol). The pH was then adjusted to 5 using glacial AcOH (5 drops) and mixture was then stirred at 70°C for 1.5 h. When TLC showed full starting material consumption, mixture was added to water and extracted with DCM. Combined organic layers were washed with brine, dried by sodium sulfate and concentrated *invacuo*. Purification by flash chromatography (0 to 55% EtOAc : Hexanes) afforded product (21.1 mg, 37%) as a yellow solid.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.69-7.67 (m, 4H) 7.43-7.24 (m, 11H) 4.57 (q, 1H, $J = 7.6$ Hz) 3.79 (q, 2H, $J = 8.4$ Hz) 3.58 (sept, 1H, $J = 5.2$ Hz) 2.87-2.83 (m, 1H) 2.53 (t, 1H, $J = 10.0$ Hz) 1.05 (s, 9H) 1.01 (d, 3H, $J = 6.8$ Hz) 0.81 (s, 3H) 0.74 (s, 3H)

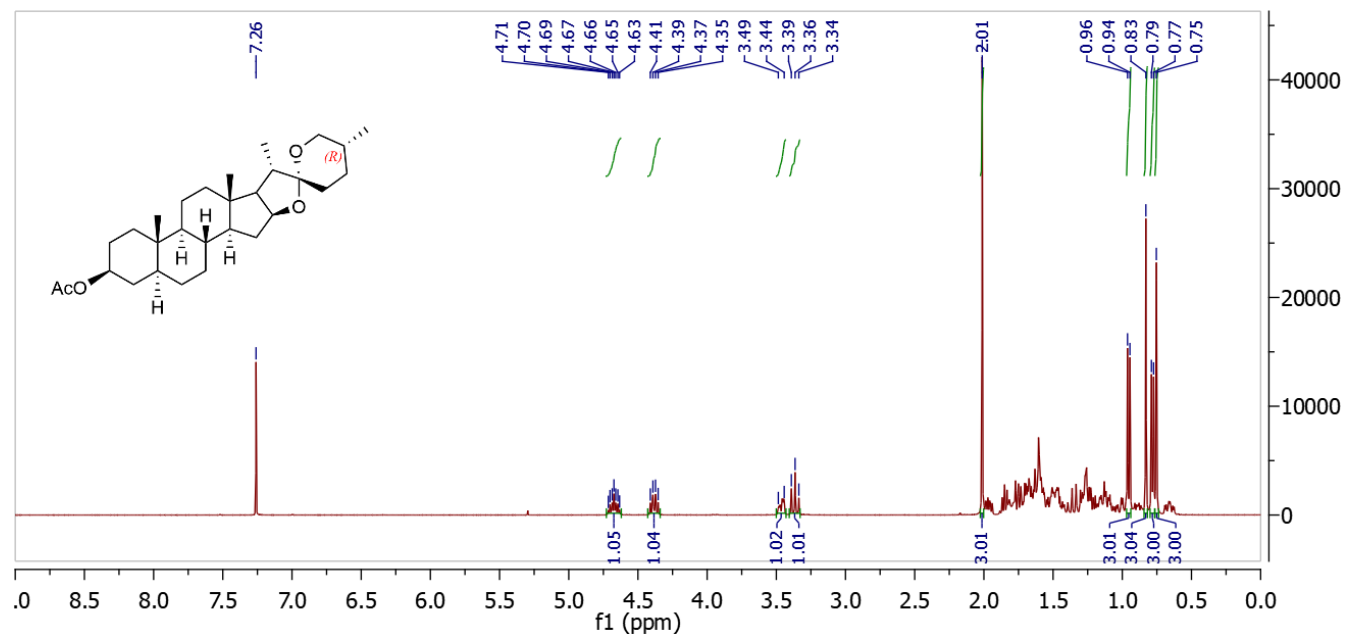
^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 141.4 (s), 138.9 (s), 135.9 (s), 135.0 (d), 129.5 (s), 128.6 (s), 128.5 (s), 128.3 (s), 127.9 (s), 127.5 (d), 127.3 (s), 126.5 (s), 109.3 (d), 80.7 (s), 72.9 (s), 63.0 (s), 60.9 (s), 56.3 (s), 55.7 (s), 54.4 (d), 53.3 (s), 51.9 (s), 50.5 (s), 49.3 (s), 44.9 (s), 42.3 (s), 41.4 (s), 40.7 (s), 40.4 (s), 40.2 (s), 38.8 (s), 38.5 (s), 37.1 (s), 35.6 (d), 35.2 (s), 35.0 (s), 31.8 (s), 30.5 (s), 28.8 (d), 27.1 (s), 21.8 (s), 21.1 (s), 19.3 (s), 17.1 (s), 16.7 (s), 16.1 (s), 15.6 (s), 12.5 (s).

NOTE : Product is unstable and decomposes rapidly in NMR tube.

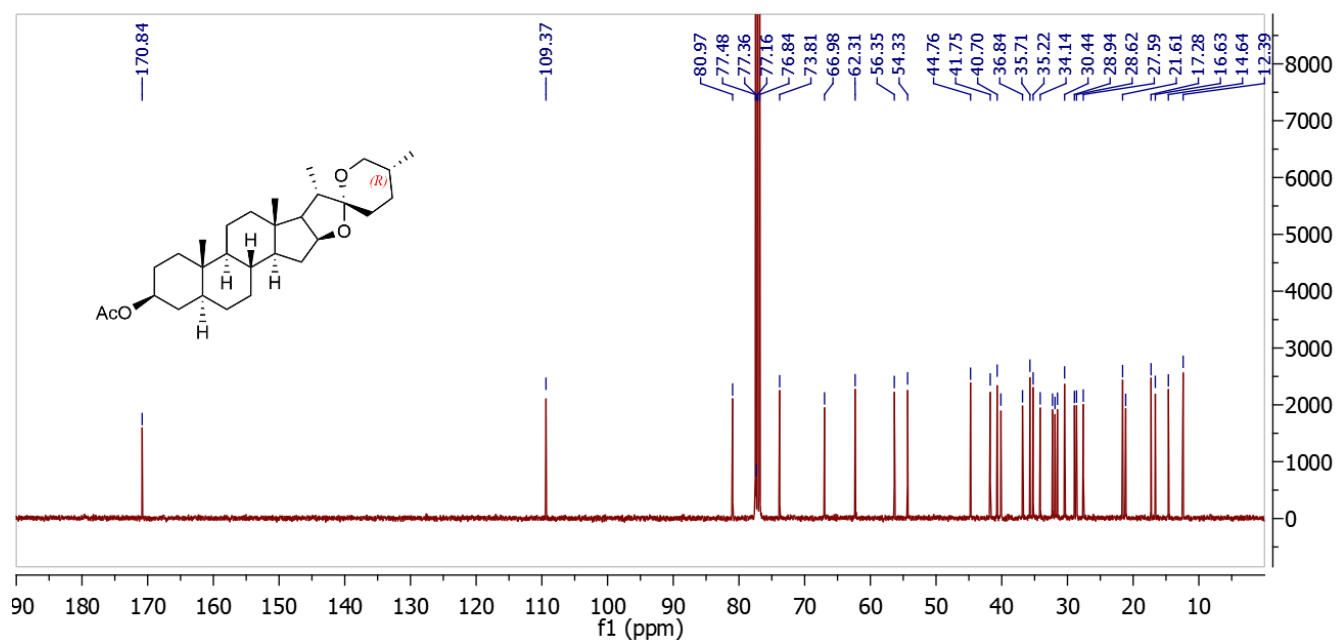
ANNEXE 2 : SPECTRES DE RÉSONNANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DES TRAVAUX PRÉSENTÉS

(3 β ,5 α ,25*R*)-Spirostan-3-ol acetate (55)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

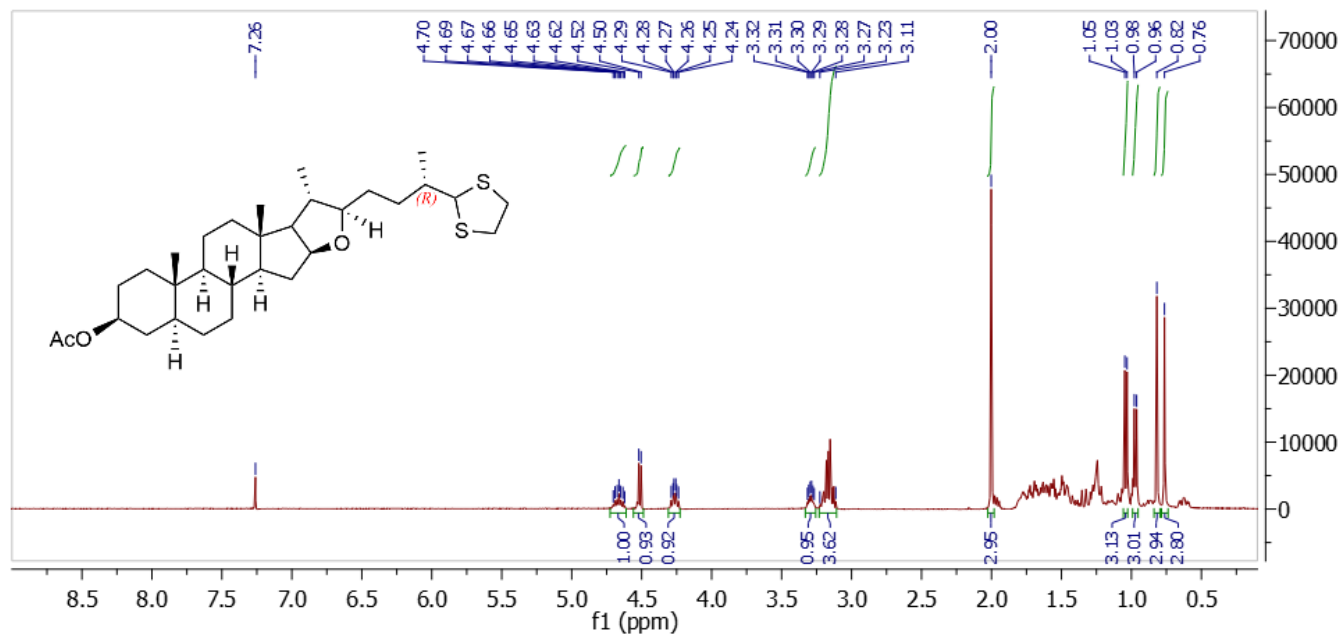


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

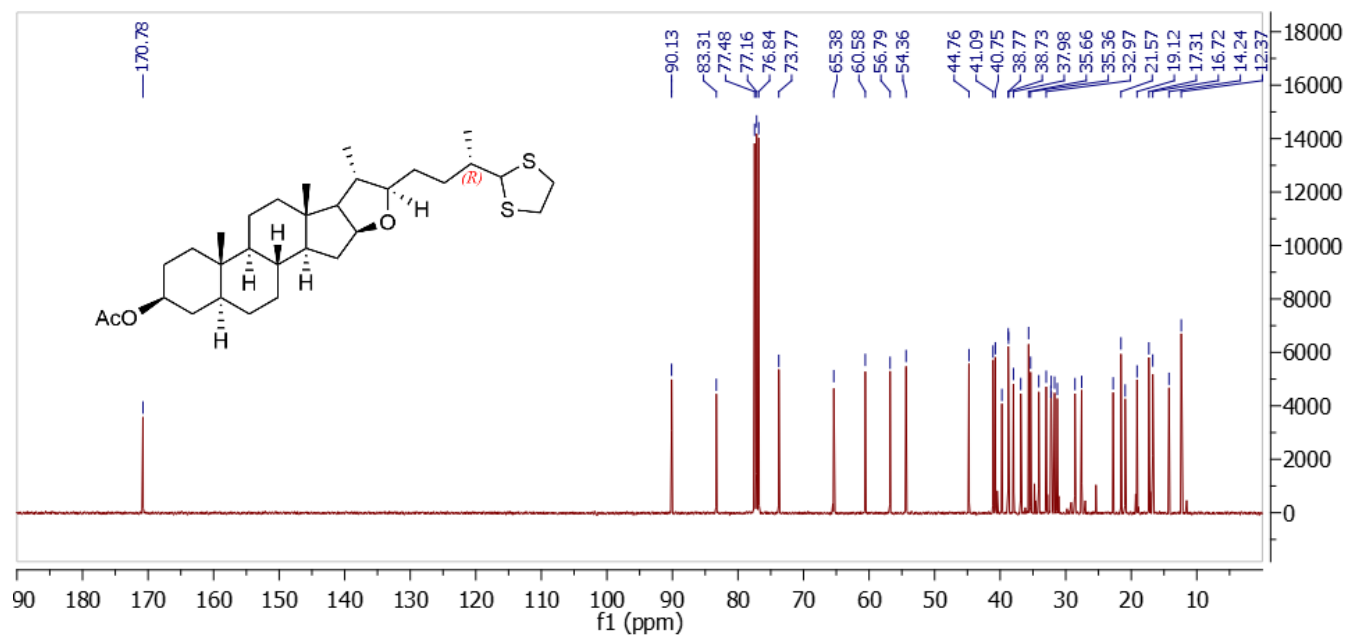


(3 β -5 α ,25*S*)-26-Ethylenethioketalfurostan-3-ol acetate (60)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

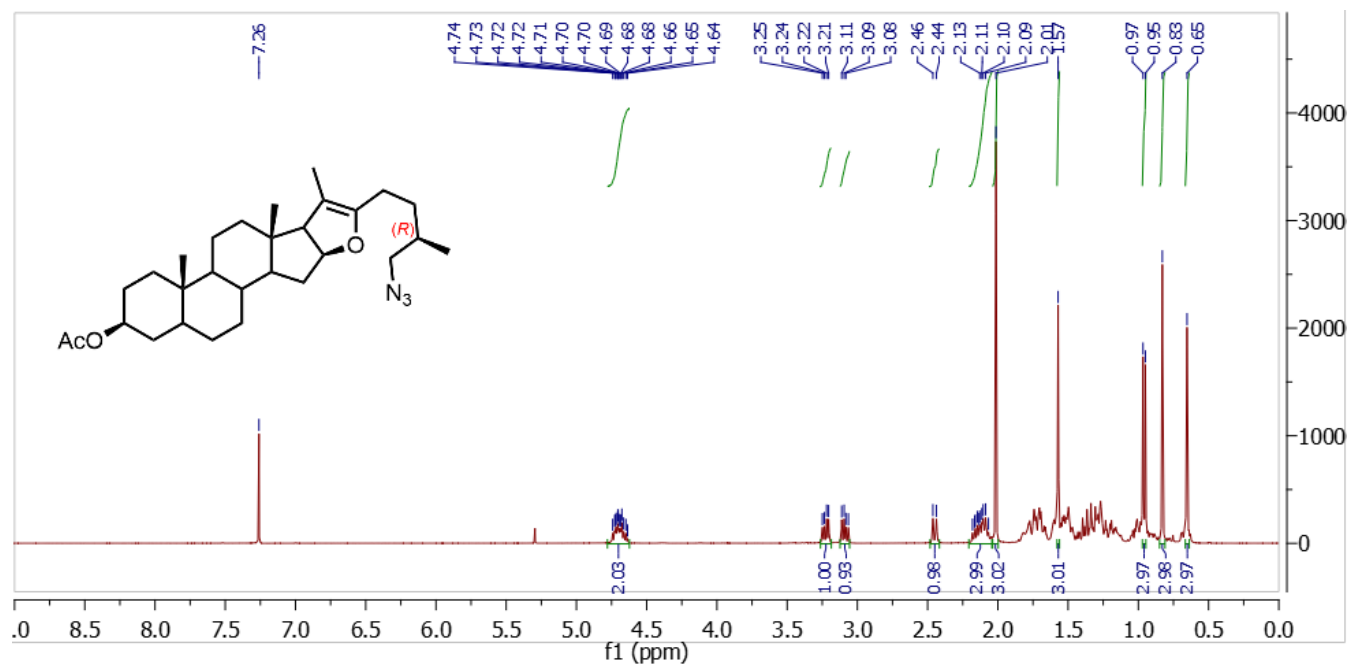


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

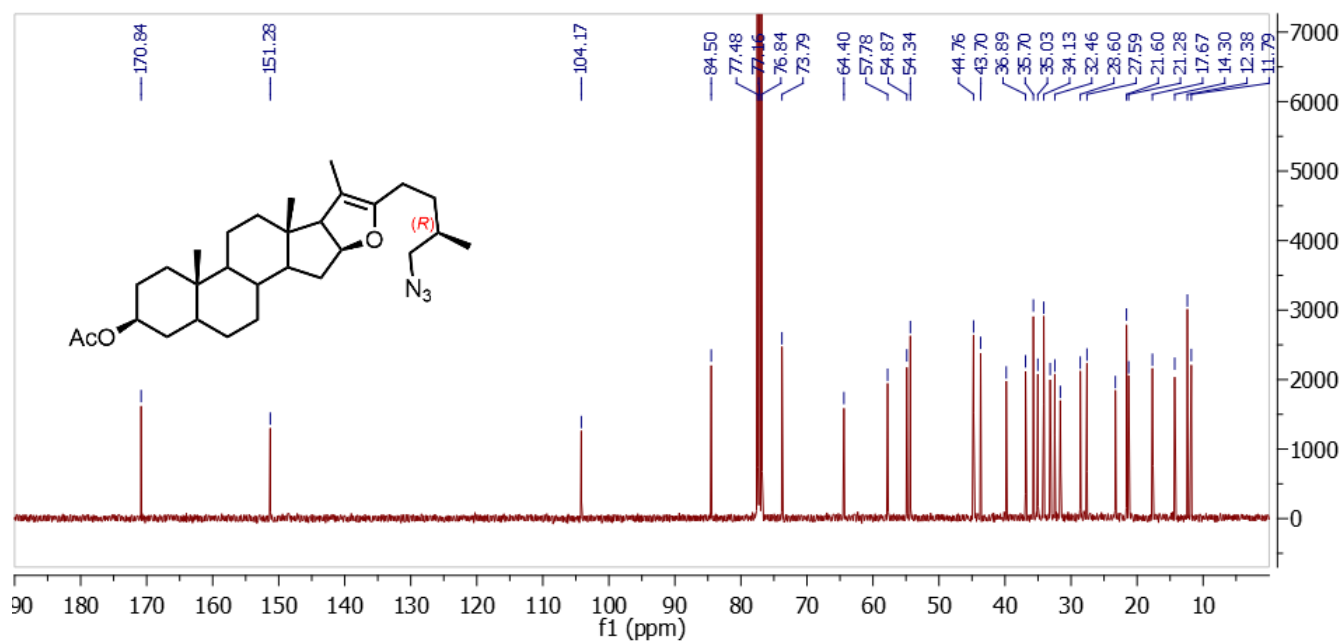


**(4S,6aS,8aS,11aS)-10-((*R*)-4-azido-3-methylbutyl)-6a,8a,9-trimethyl-2,2a,3,4,5,6,6a,6b,7,8,8a,8b,
11a,12,12a,12b-hexadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-4-yl acetate (64)**

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

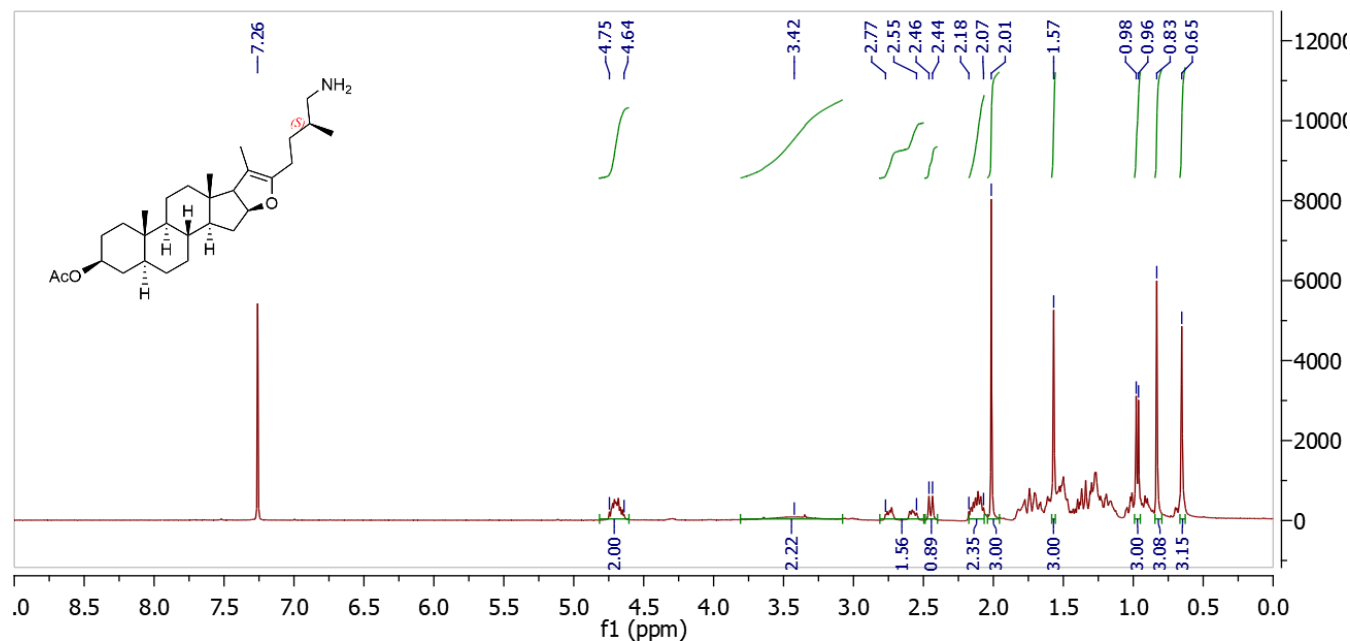


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

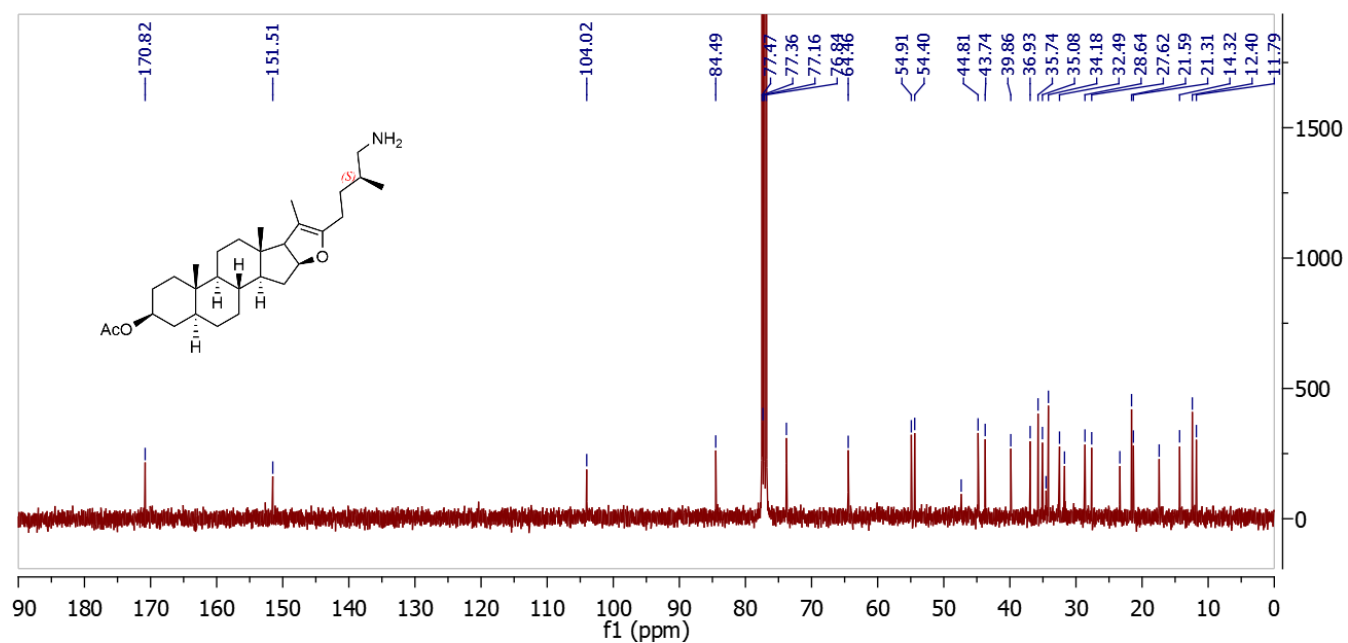


(4S,6aS,8aS,11aS)-10-((S)-4-amino-3-methylbutyl)-6a,8a,9-trimethyl-2,2a,3,4,5,6a,6b,7,8,8a,8b,11a,12,12a,12b-hexadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-4-yl acetate (**64**)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

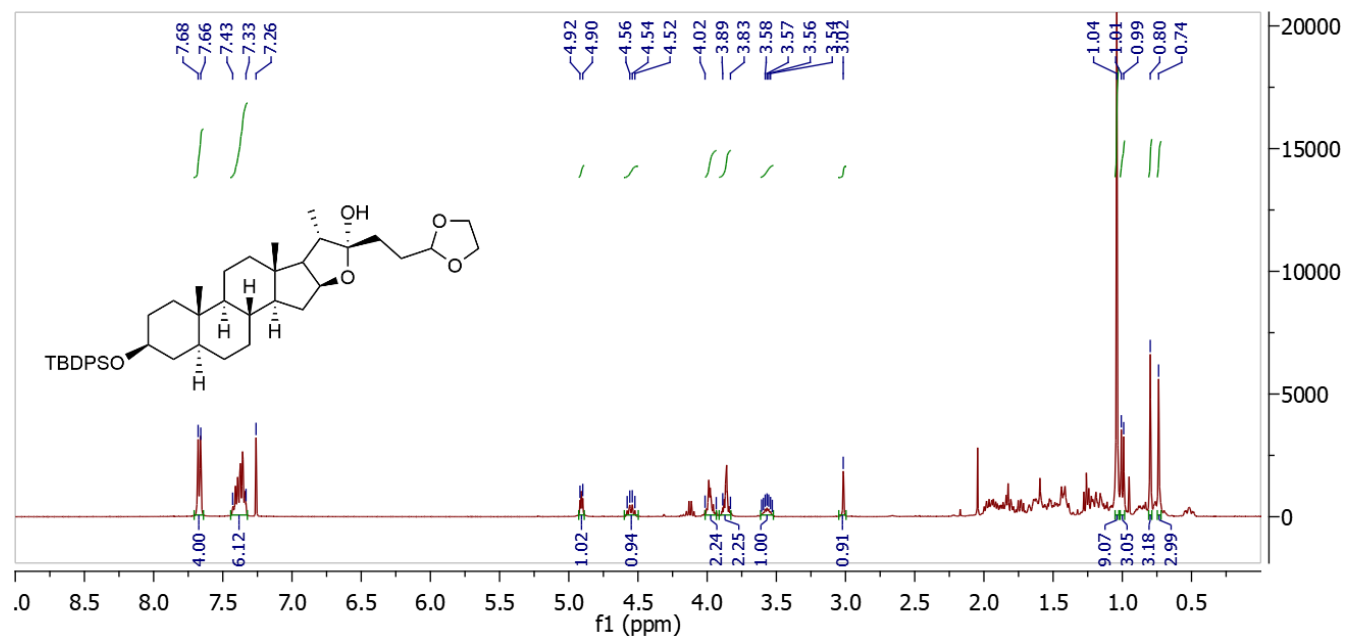


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

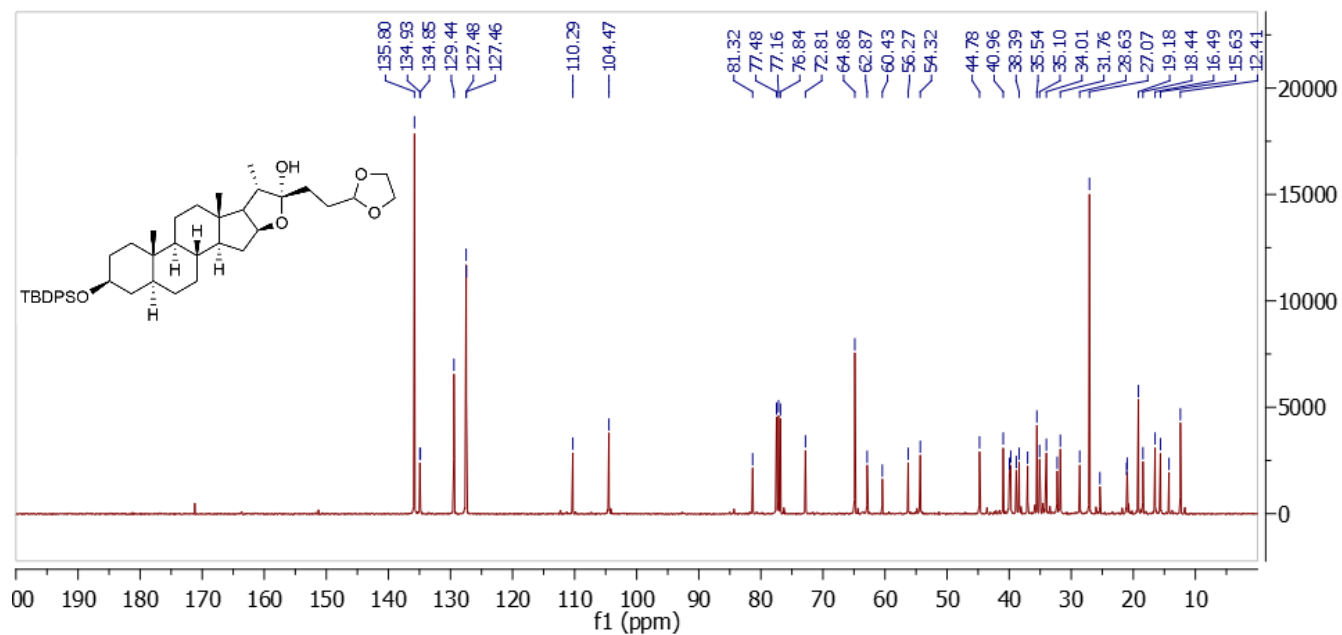


(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10R,11aS,12aS,12bR)-10-(2-(1,3-dioxolan-2-yl)ethyl)-4-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyloctadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10-ol (96)

¹H NMR spectra (400 MHz, CDCl₃)

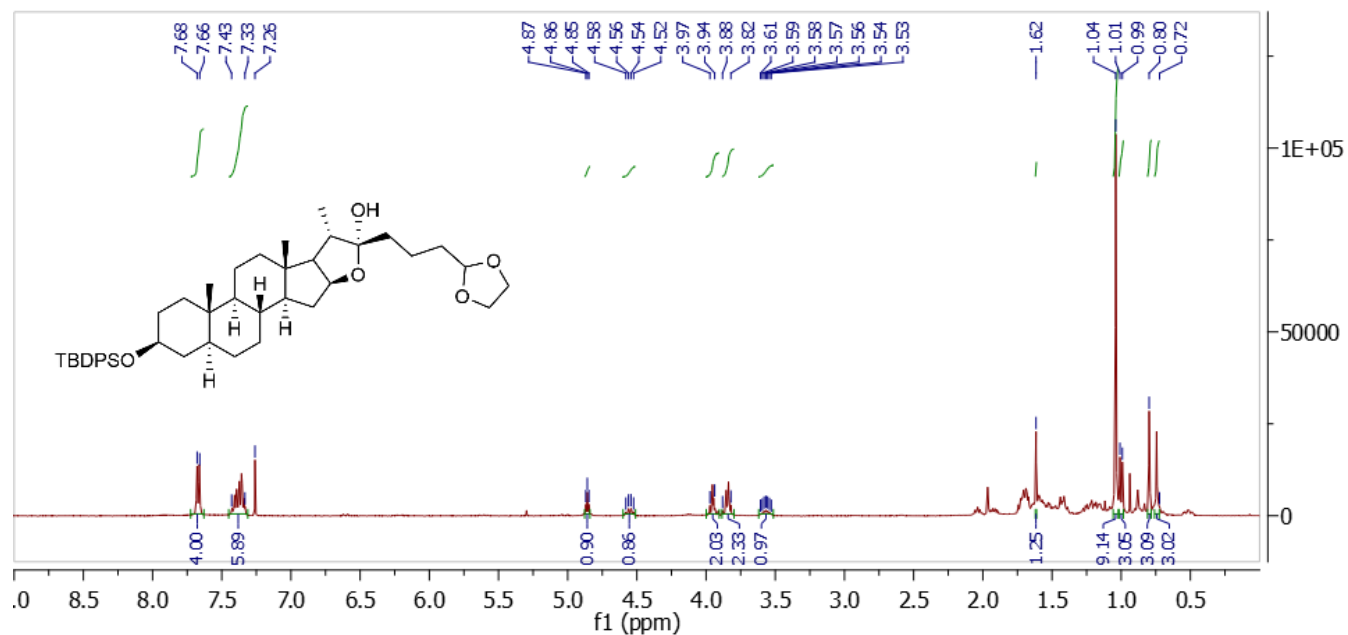


¹³C NMR spectra (100 MHz, CDCl₃)

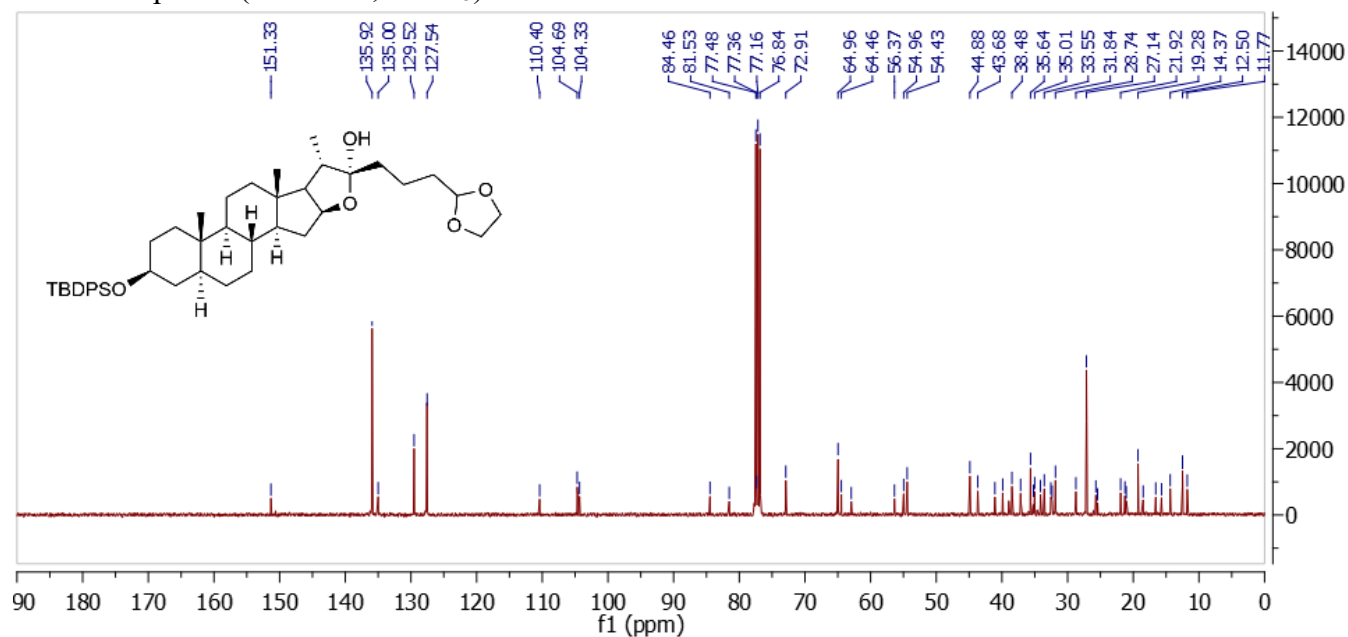


(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10R,11aS,12aS,12bR)-10-(3-(1,3-dioxolan-2-yl)propyl)-4-((tert-butylidiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyloctadecahydro-1H-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10-ol (97)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

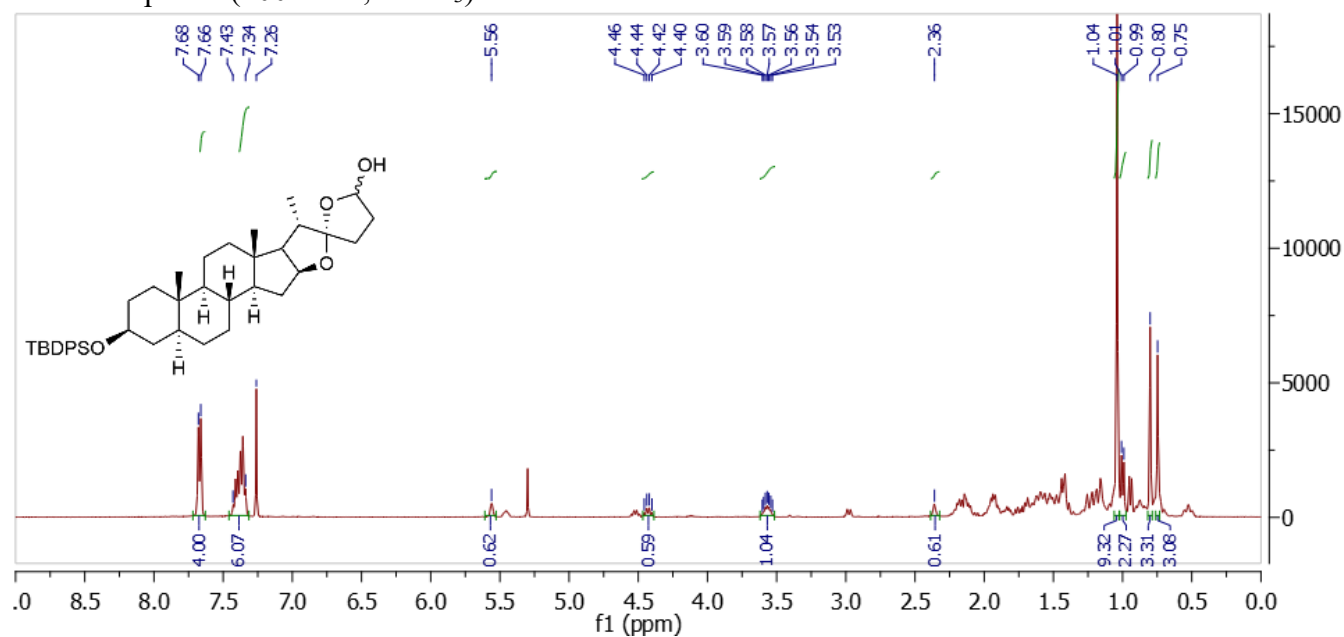


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

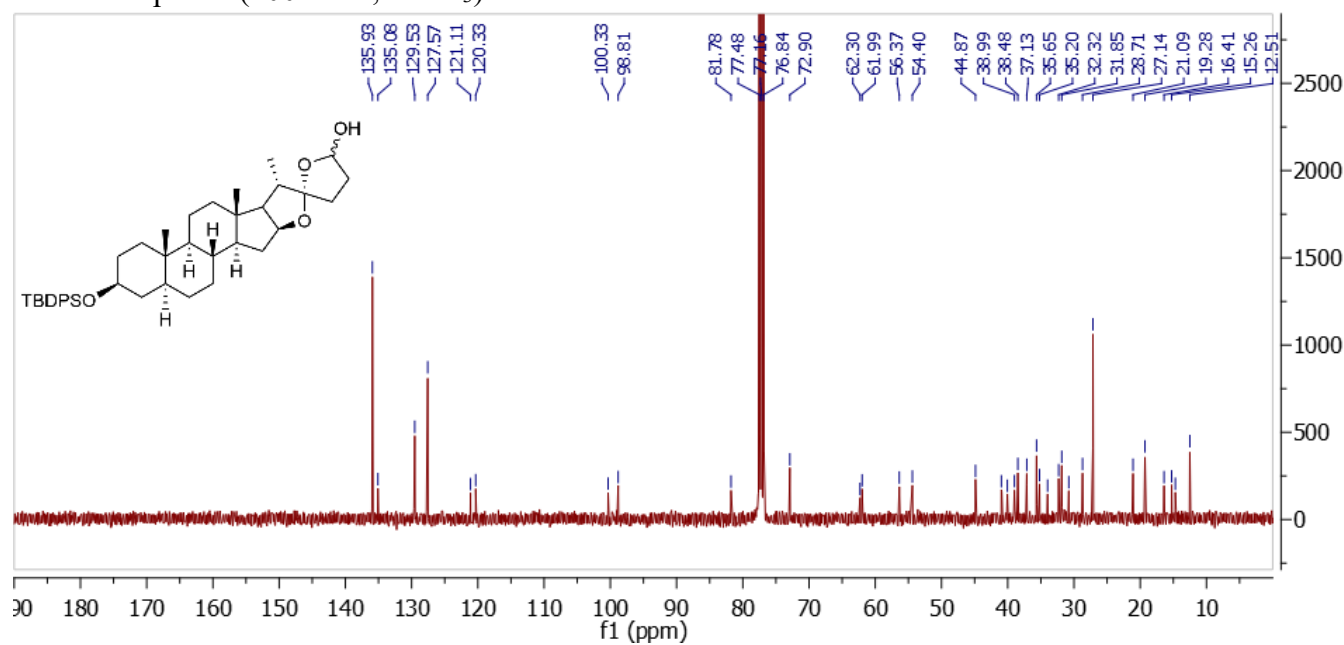


(2S,2a'S,4'S,6a'S,6b'S,8a'S,9'S,11a'S,12a'S,12b'R)-4'-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a',8a',9'-trimethylicosahydro-3H-spiro[furan-2,10'-naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan]-5-ol (98)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

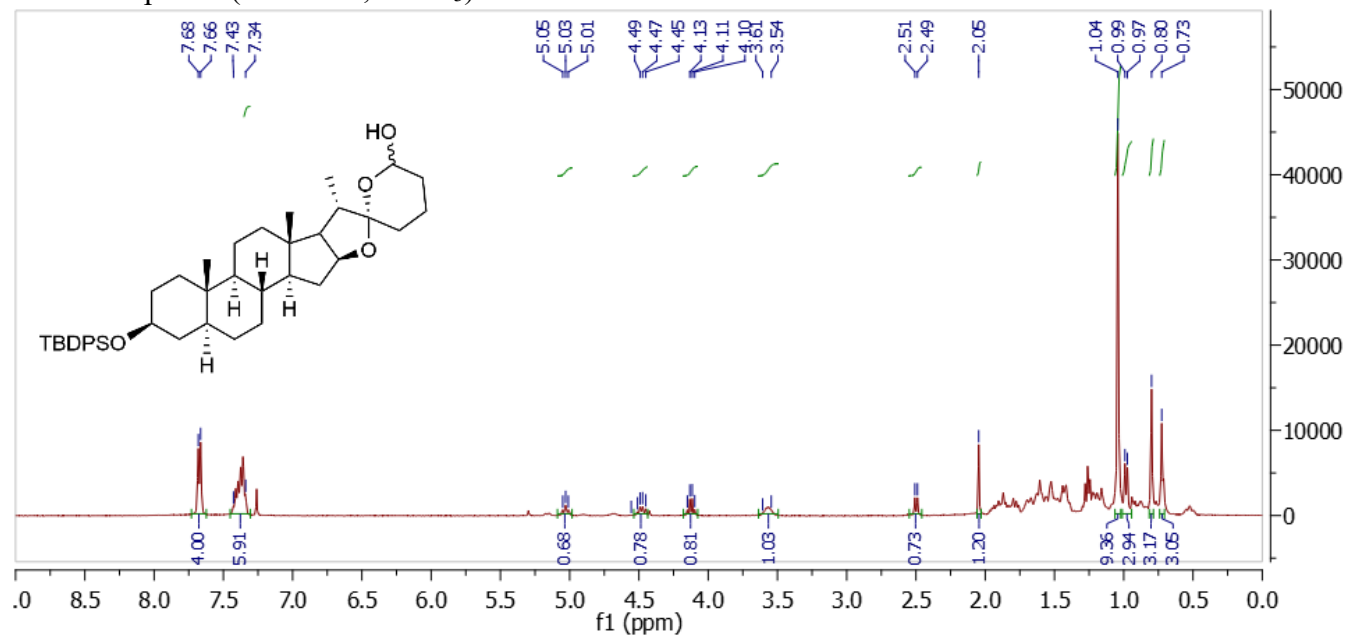


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

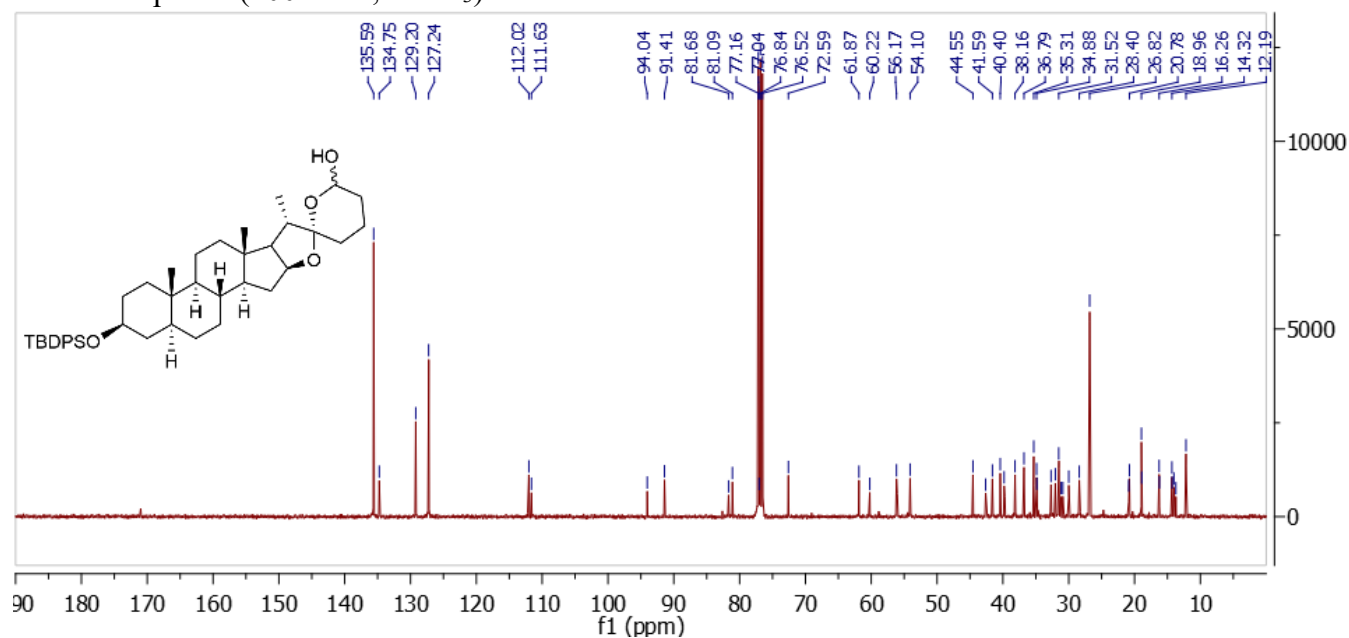


(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10S,11aS,12aS,12bR)-4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10,2'-pyran]-6'-ol (99)

^1H NMR spectra (400 MHz, CDCl_3)

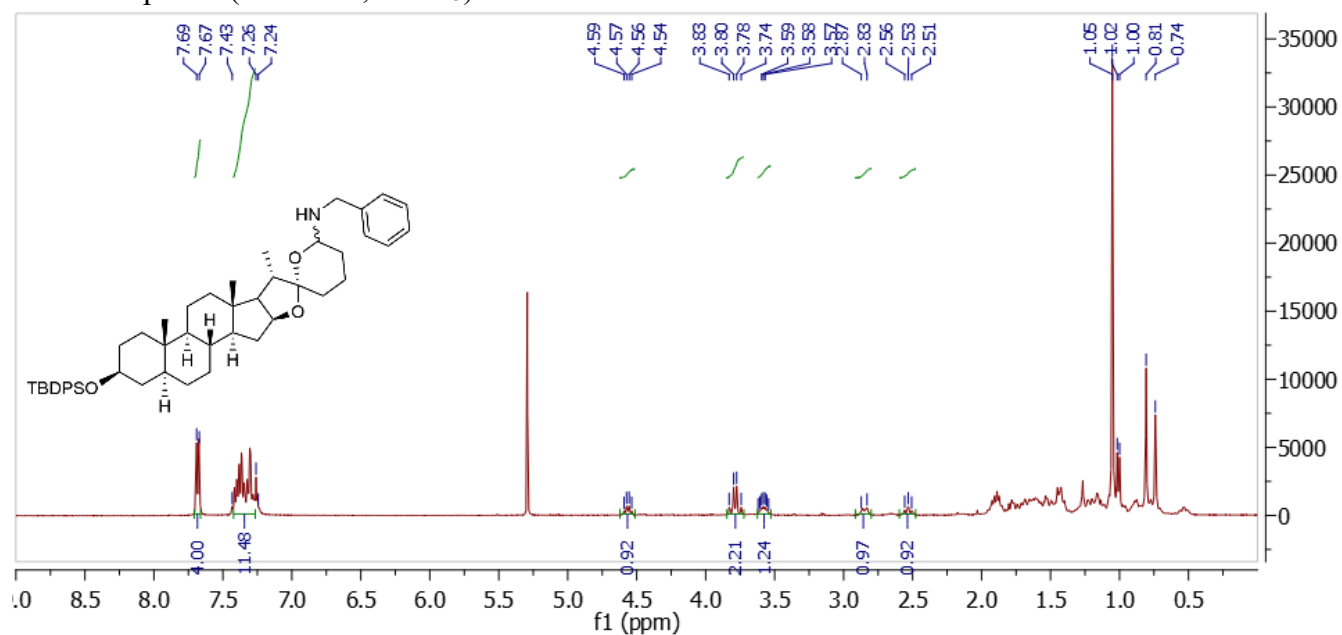


^{13}C NMR spectra (100 MHz, CDCl_3)

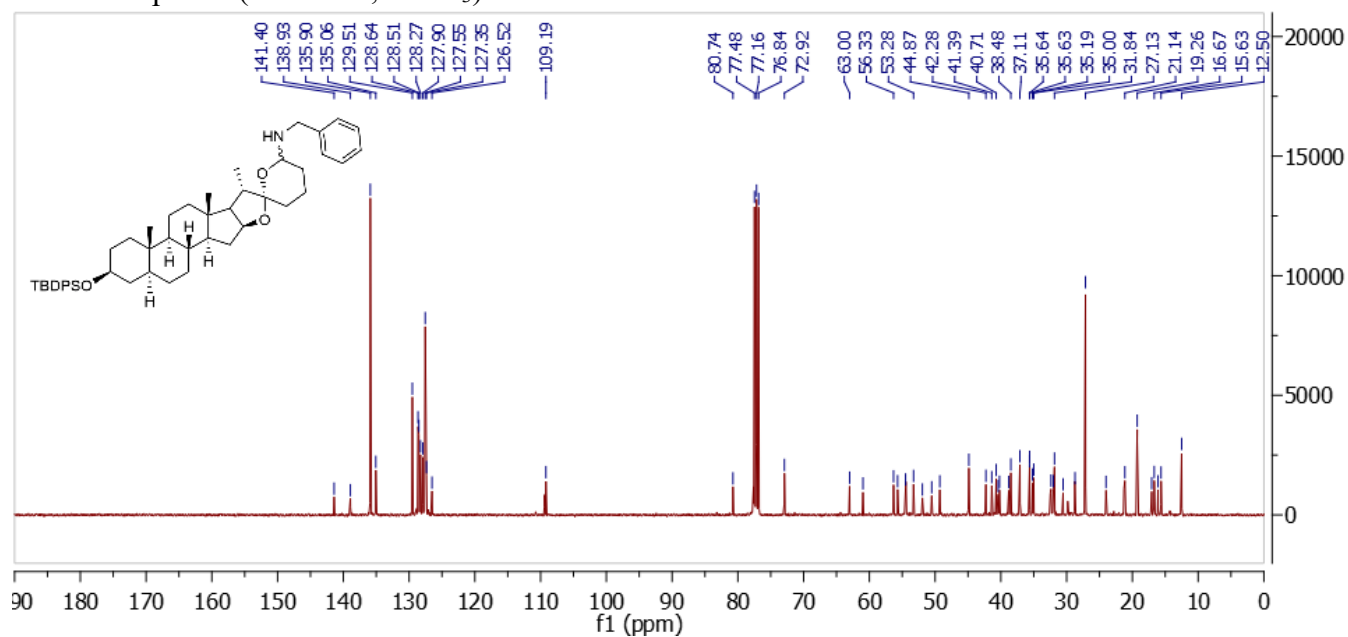


(2aS,4S,6aS,6bS,8aS,9S,10S,11aS,12aS,12bR)-N-benzyl-4-((tert-butyldiphenylsilyl)oxy)-6a,8a,9-trimethyldocosahydrospiro[naphtho[2',1':4,5]indeno[2,1-b]furan-10,2'-pyran]-6'-amine (101)

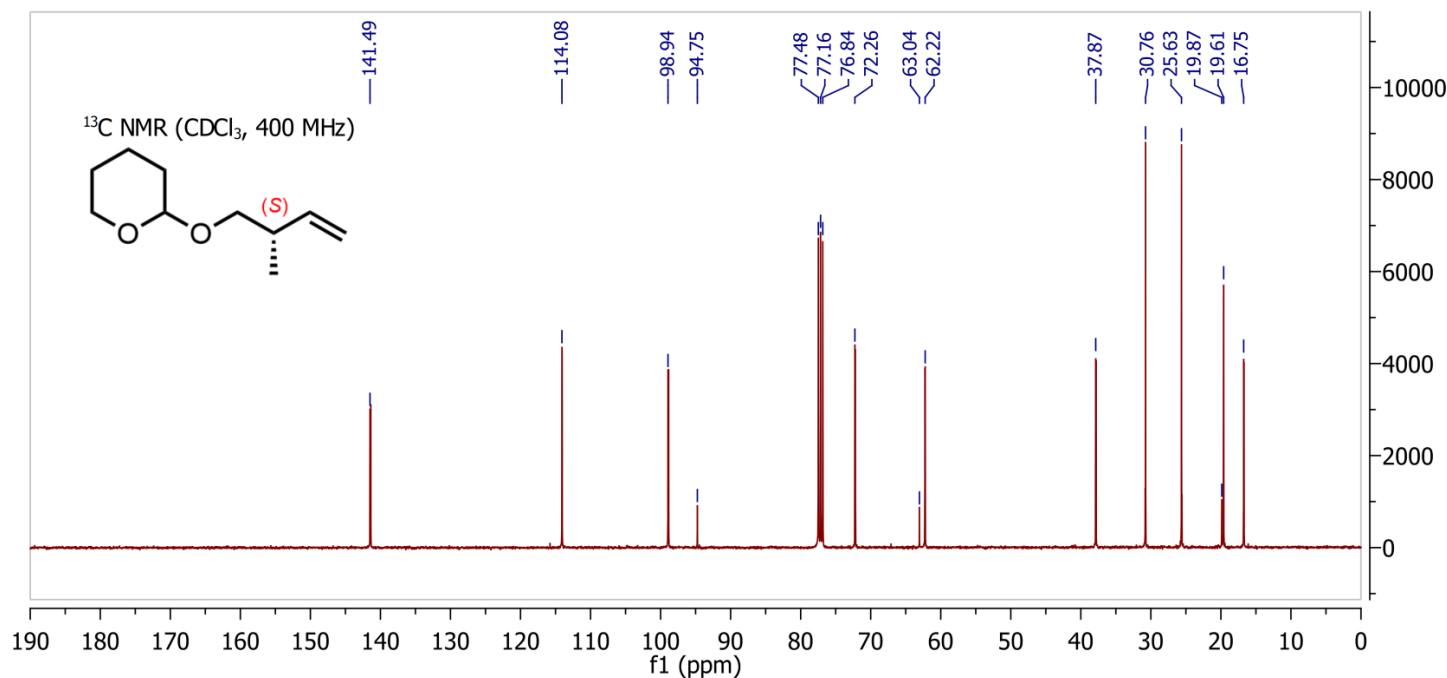
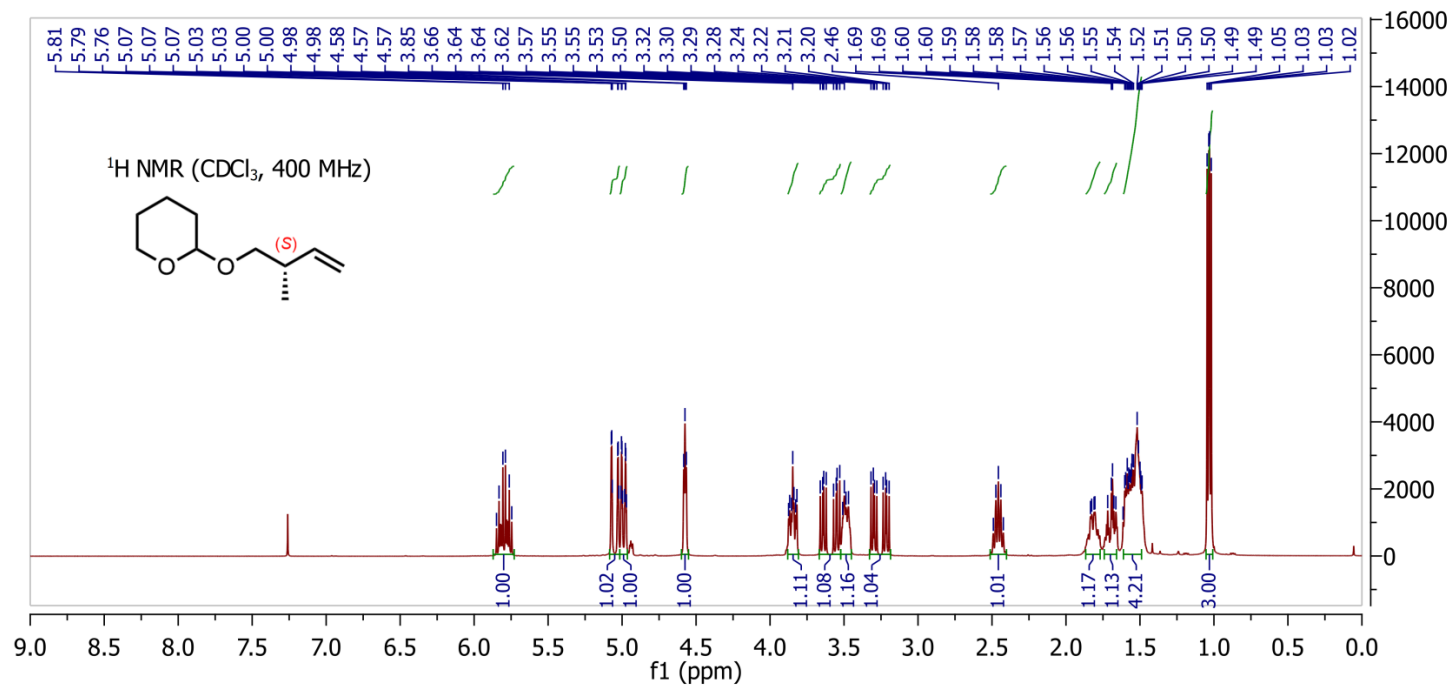
¹H NMR spectra (400 MHz, CDCl₃)

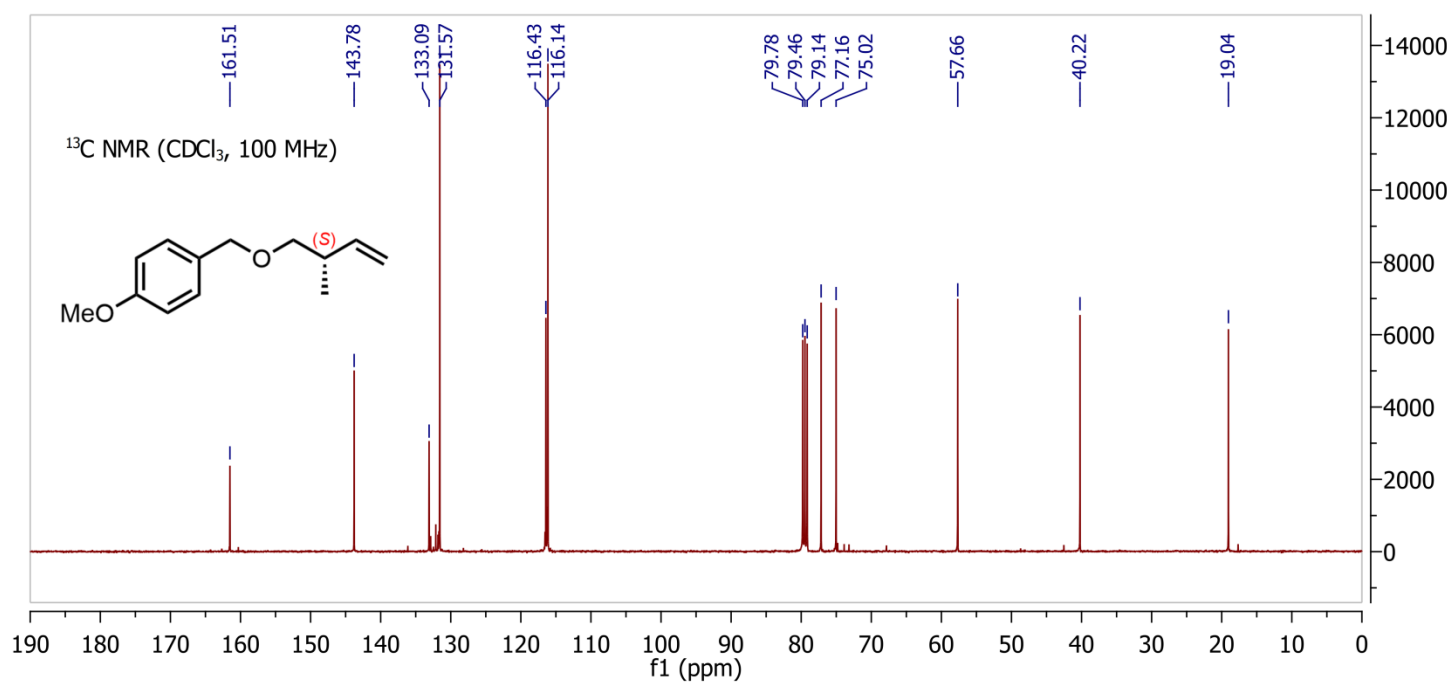
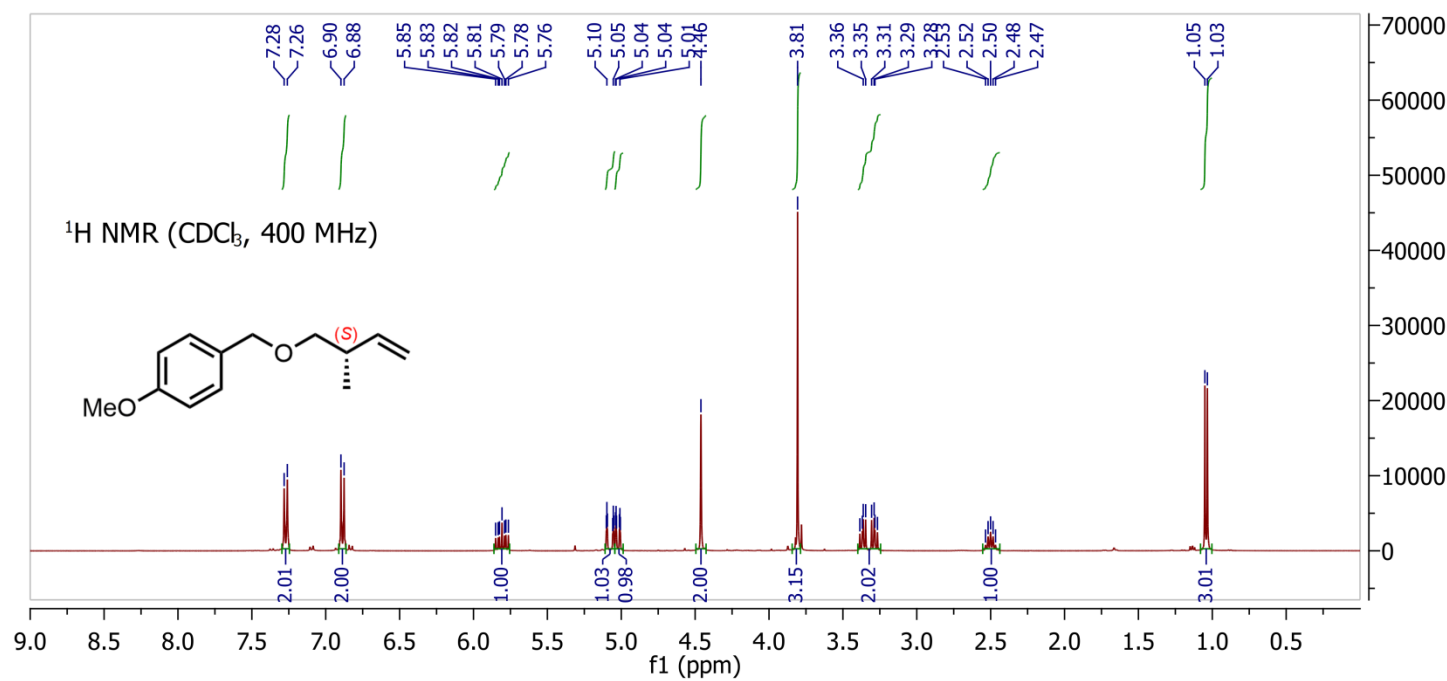


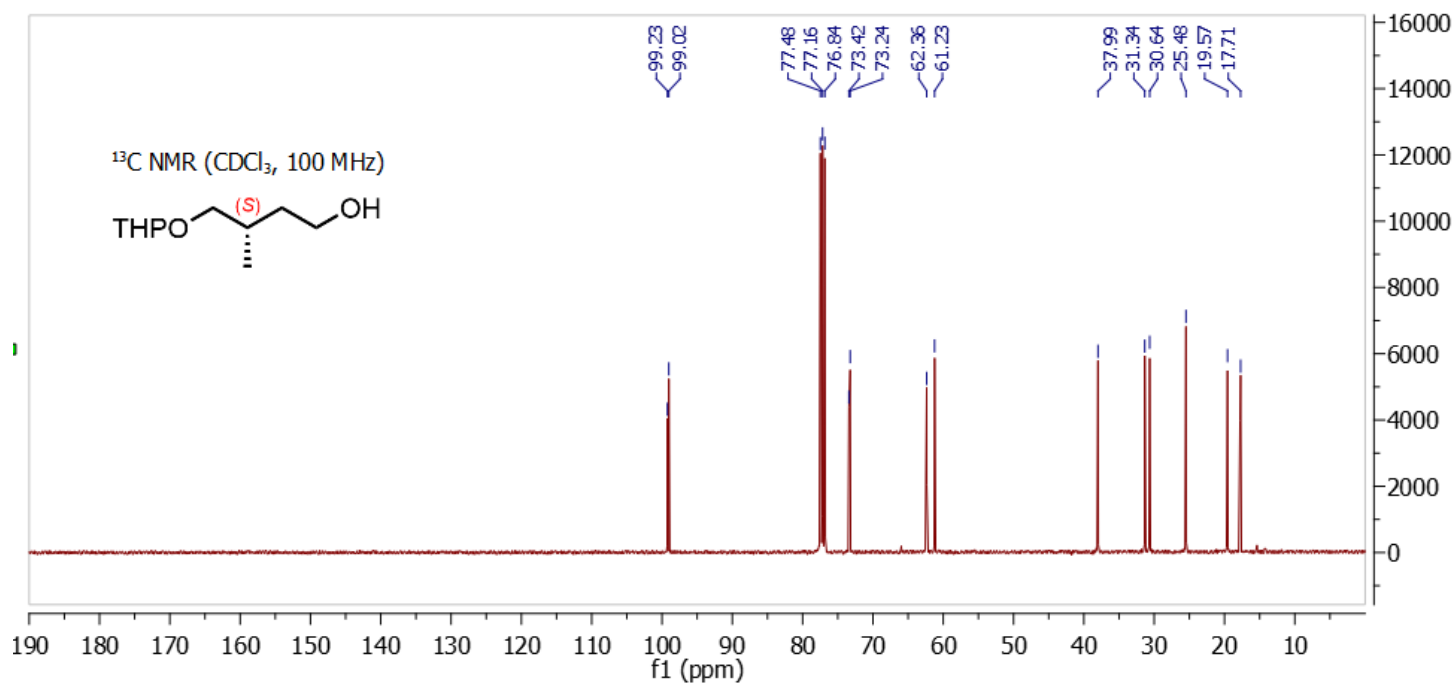
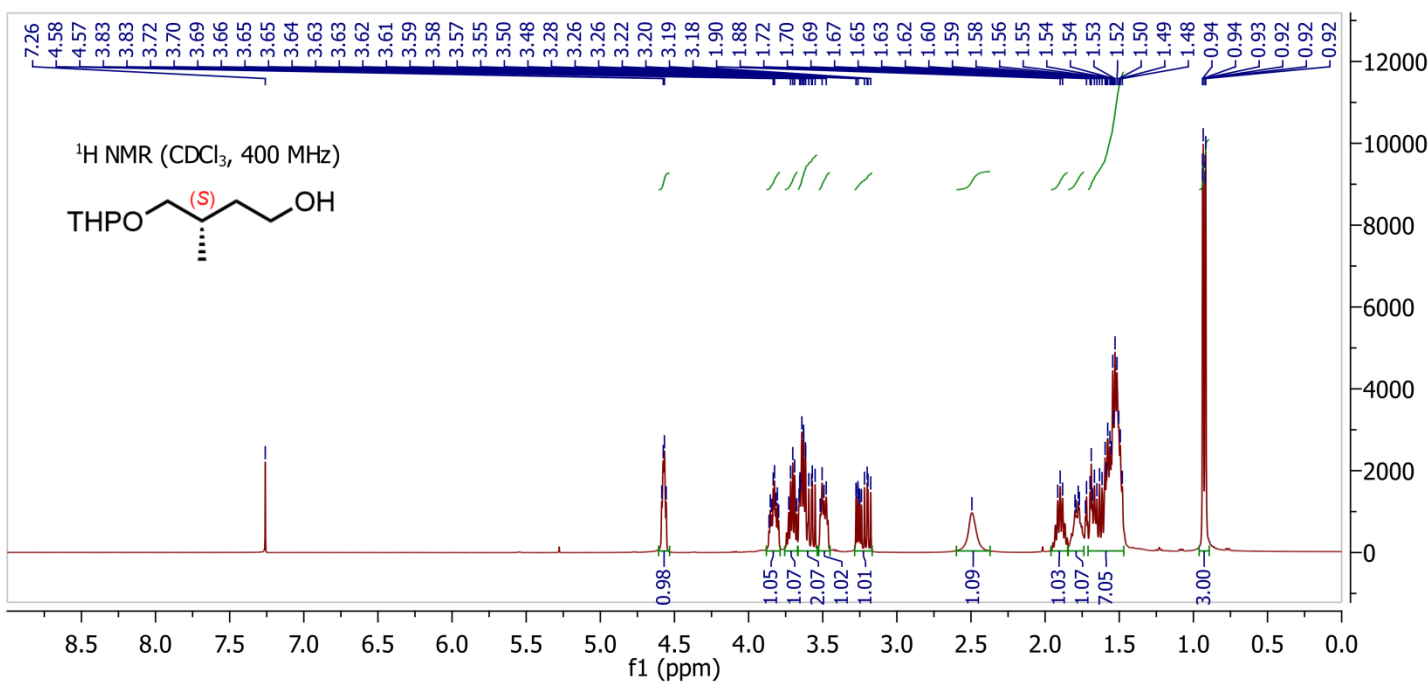
¹³C NMR spectra (100 MHz, CDCl₃)

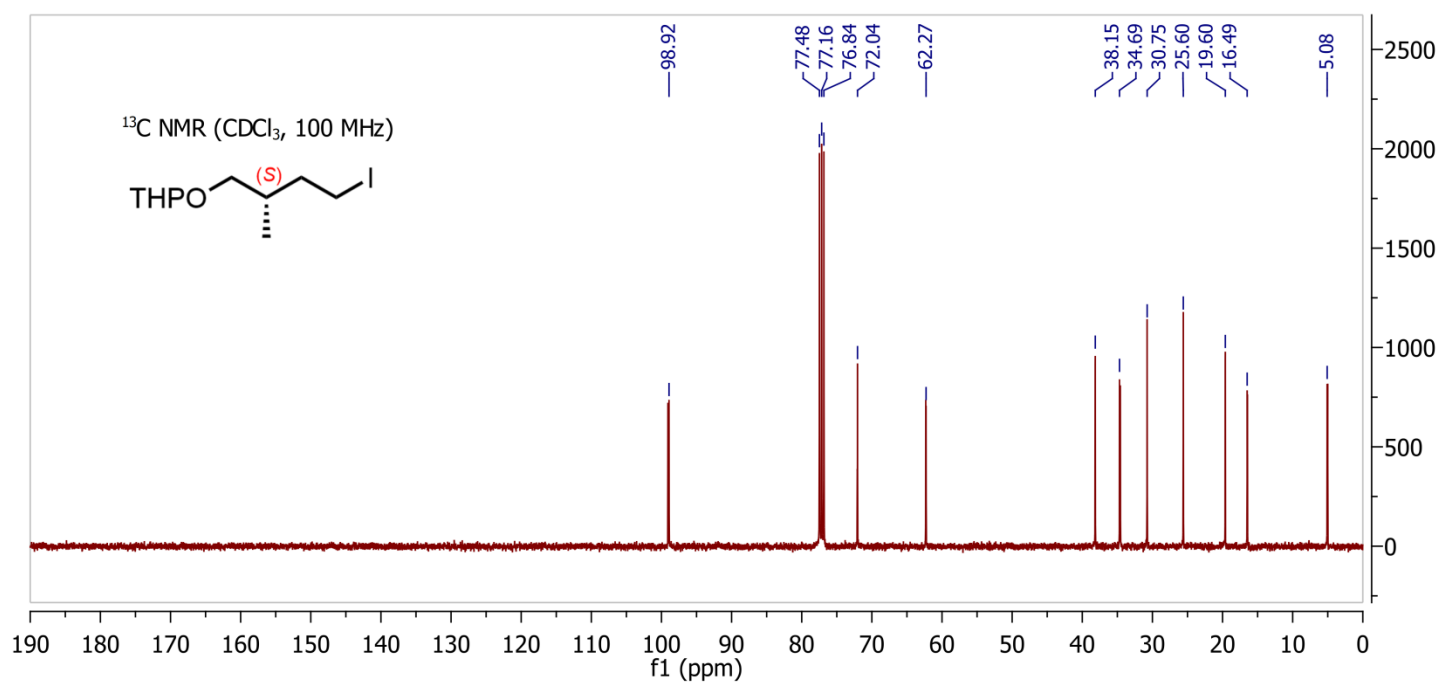
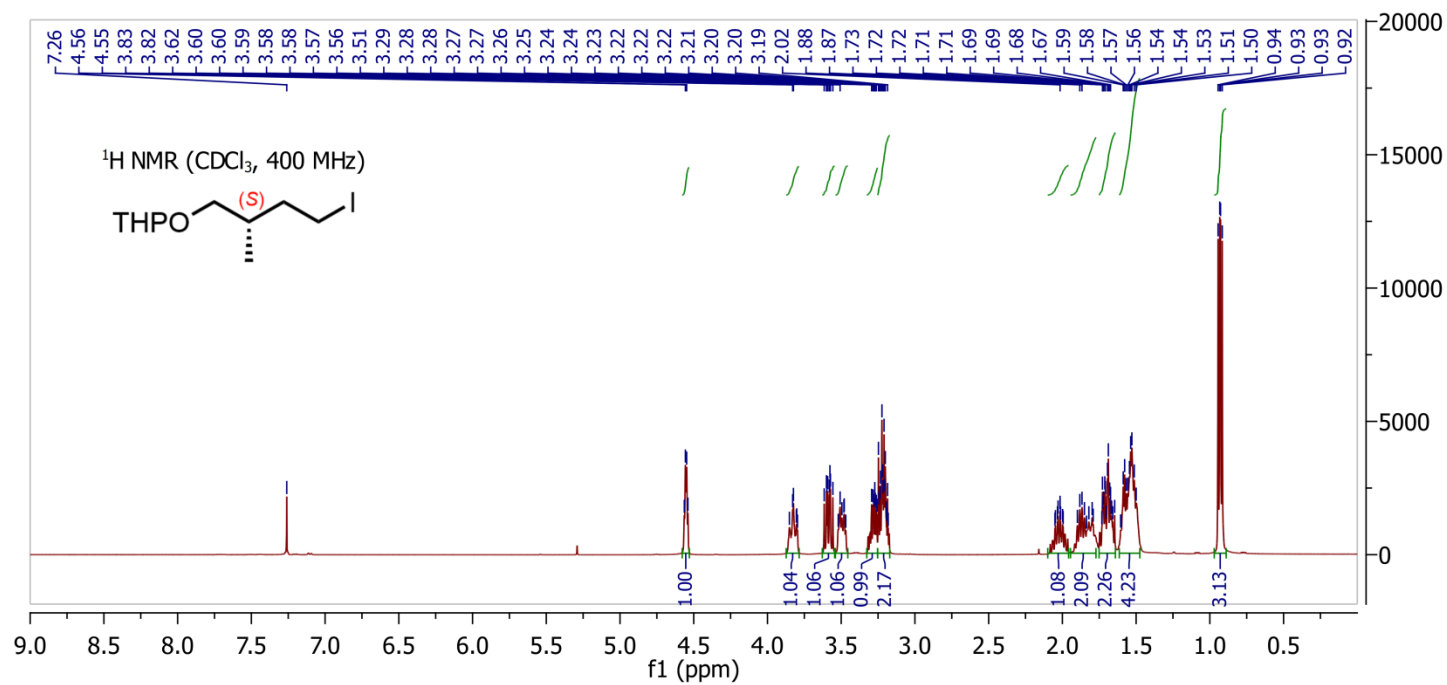


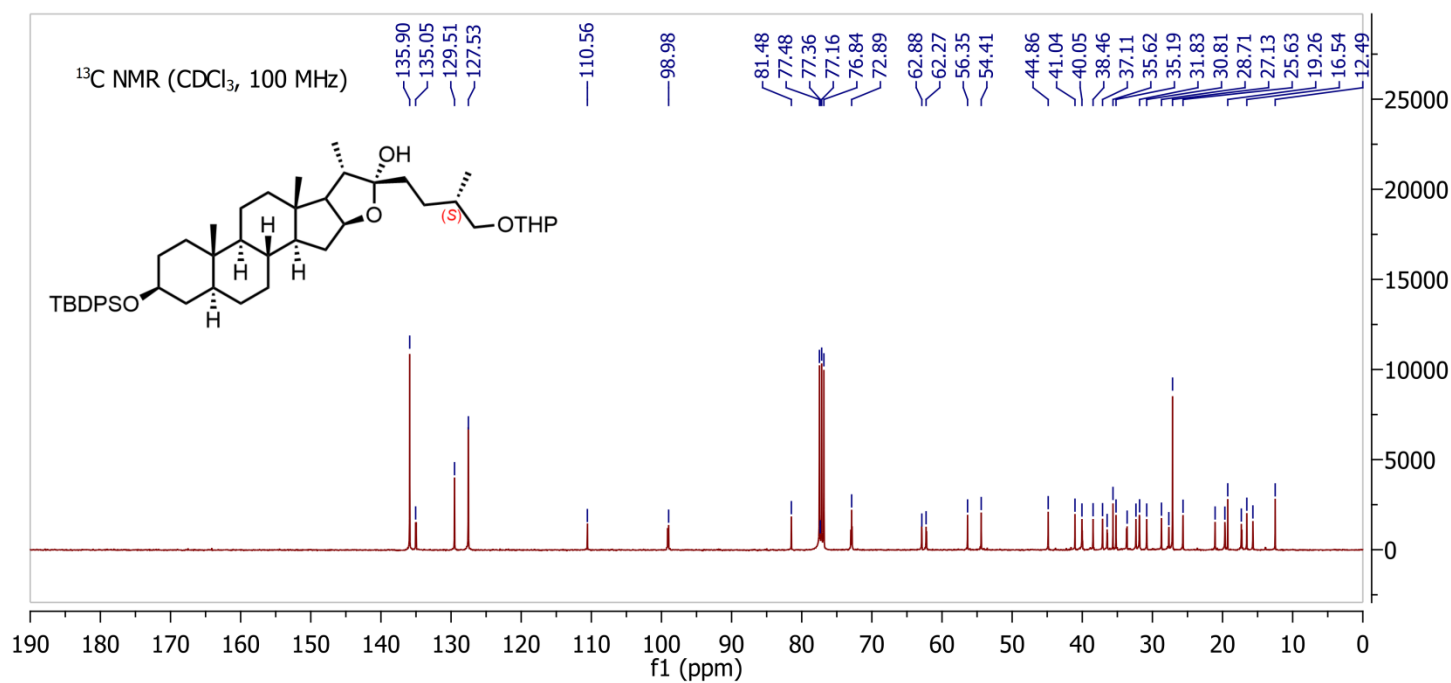
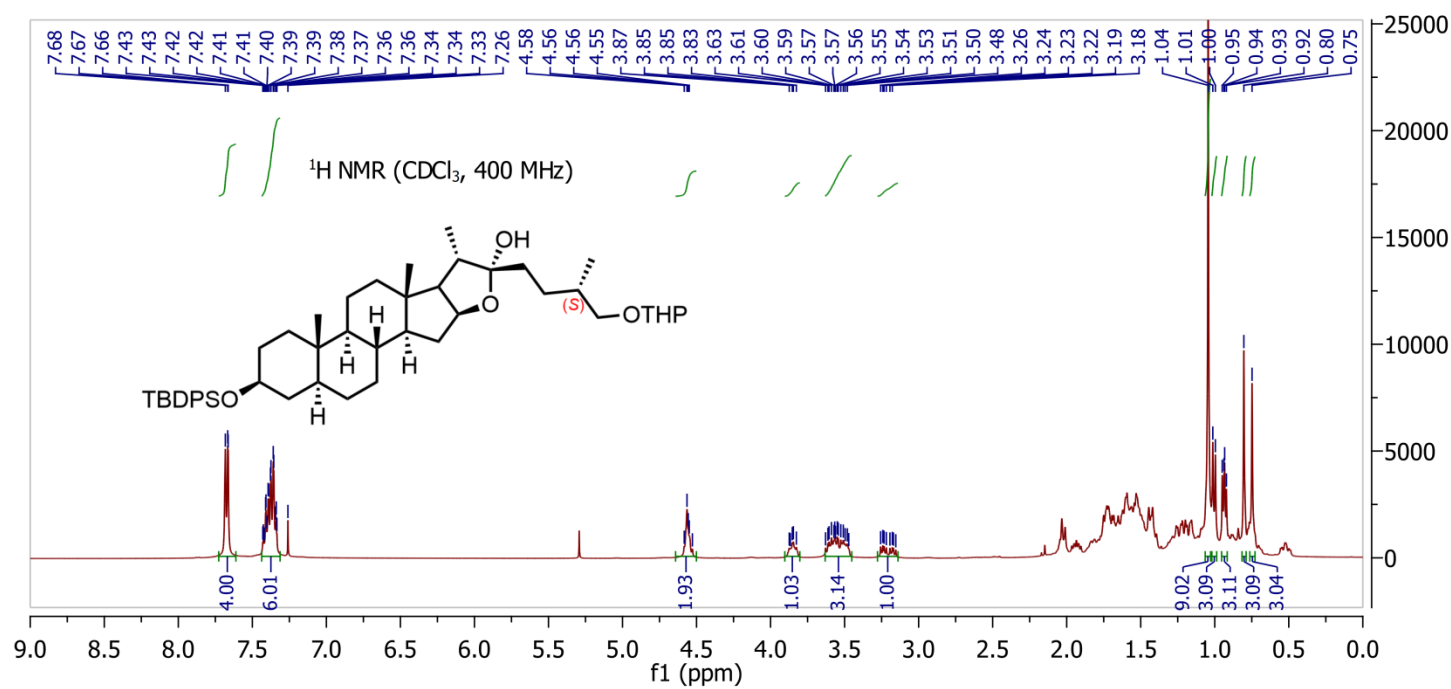
ANNEXE 3 : SPECTRES DE RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ

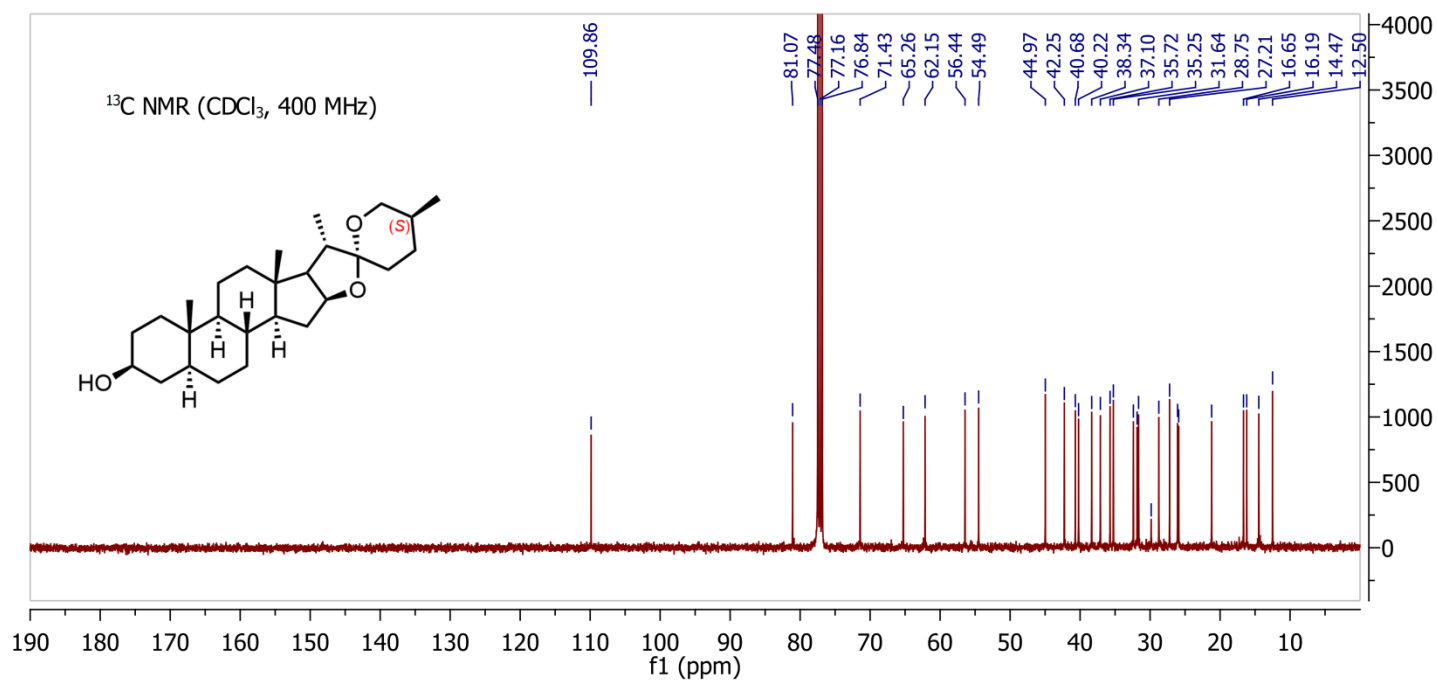
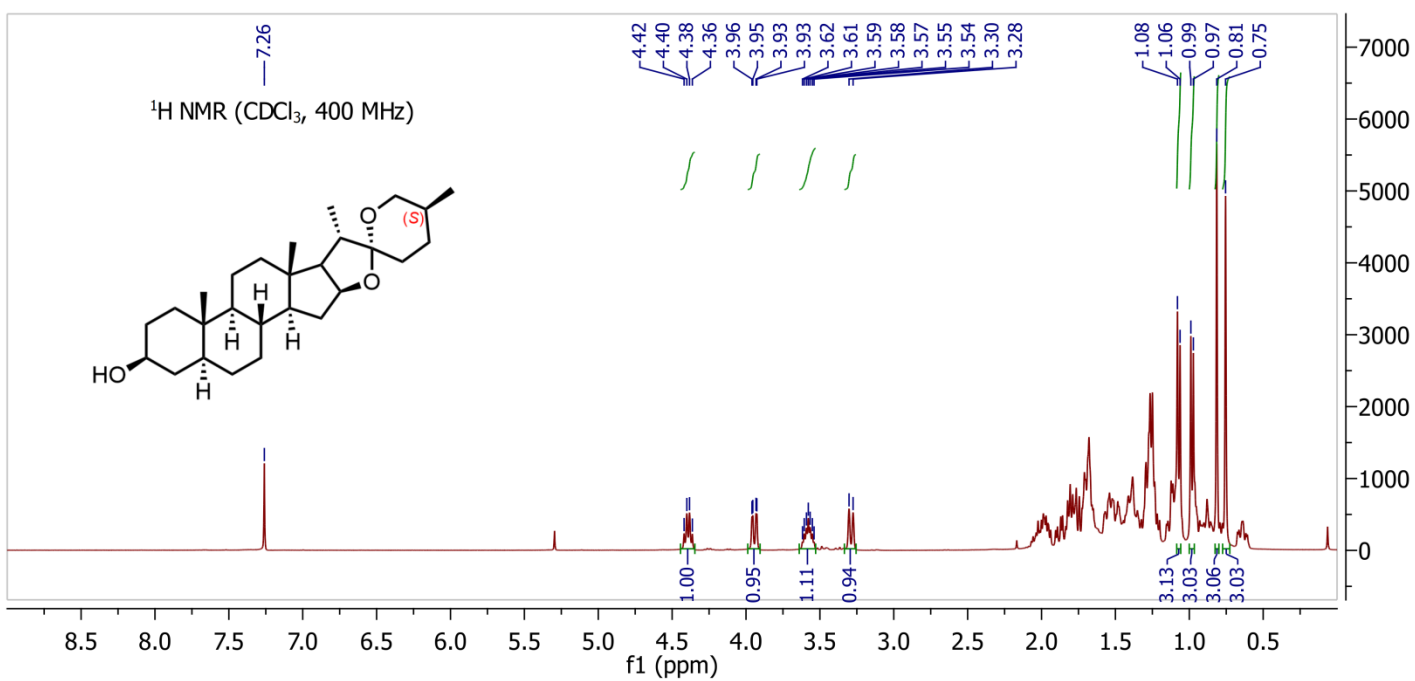


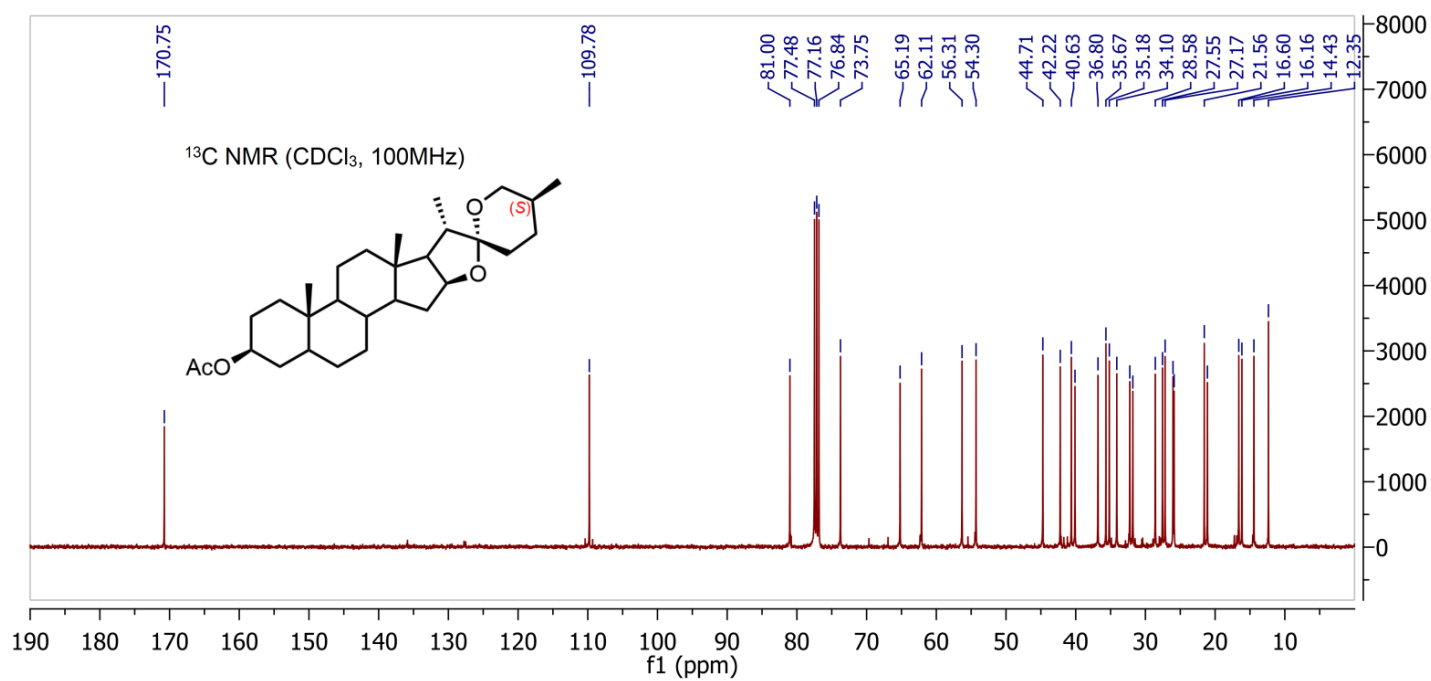
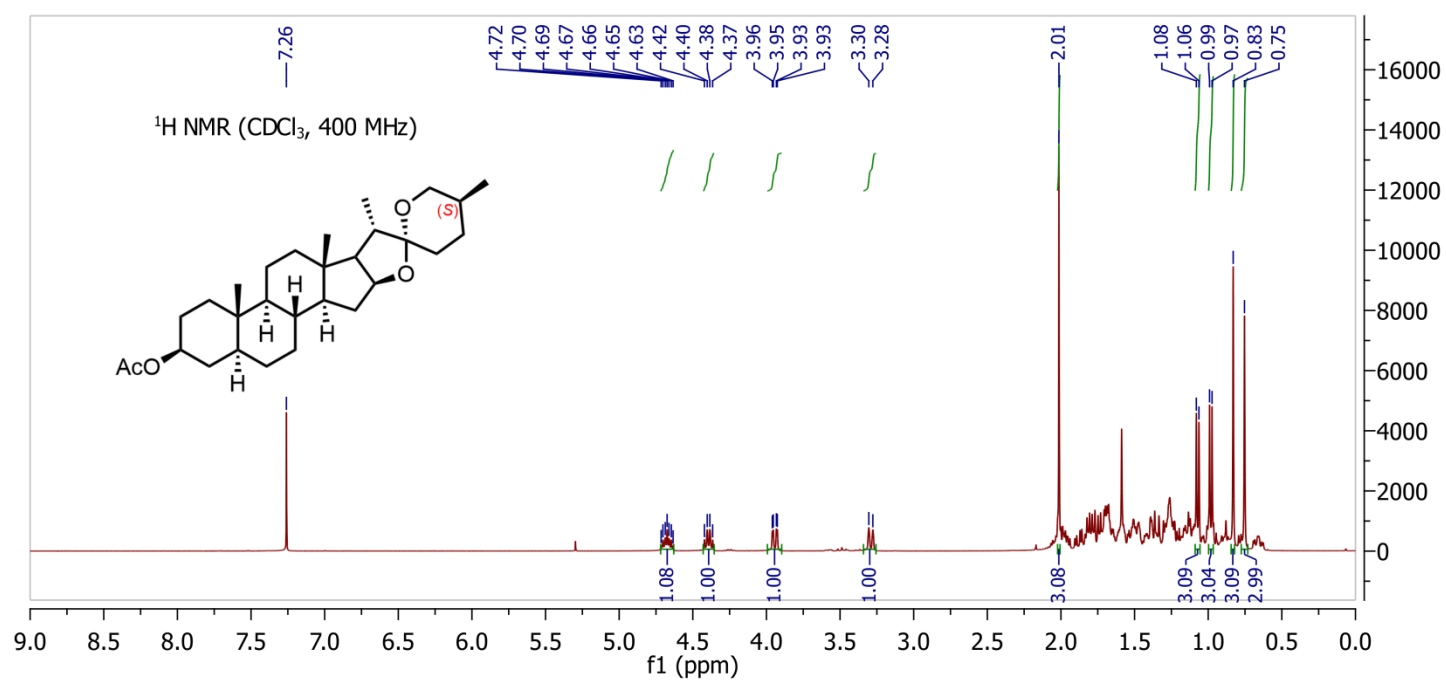


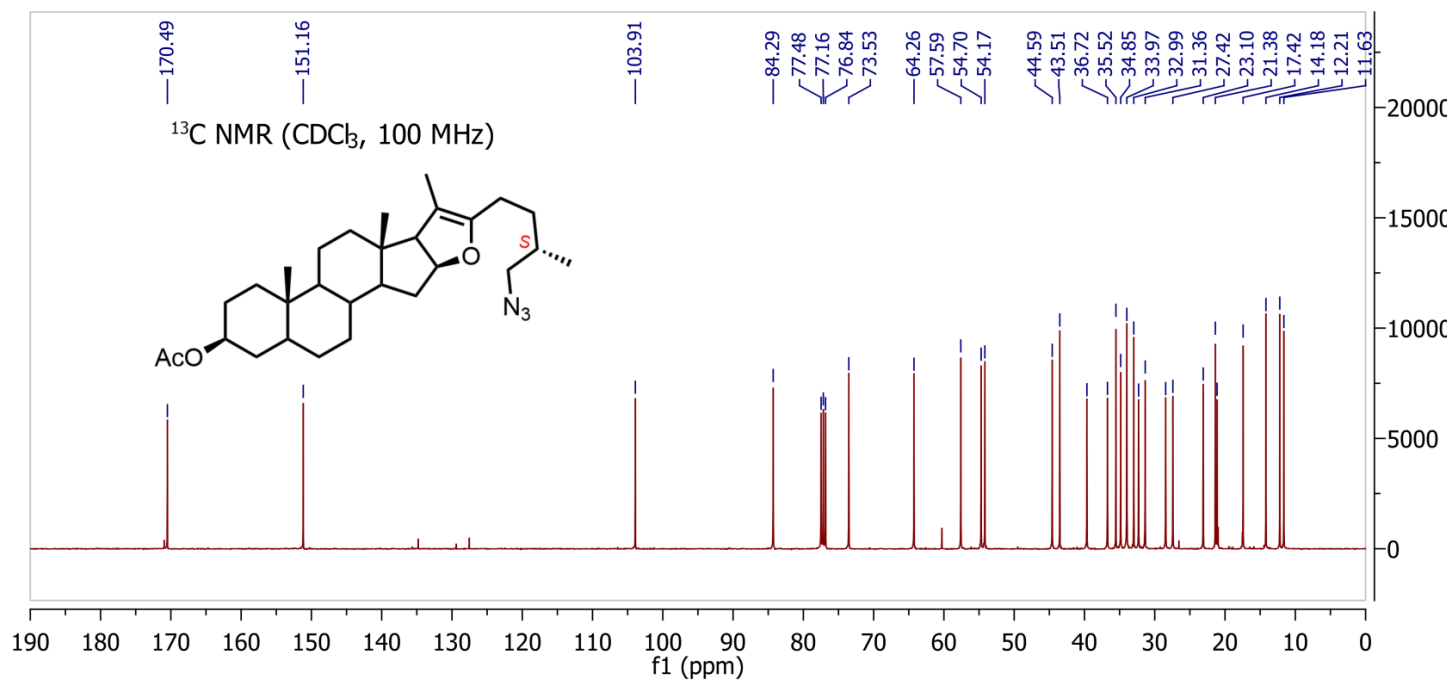
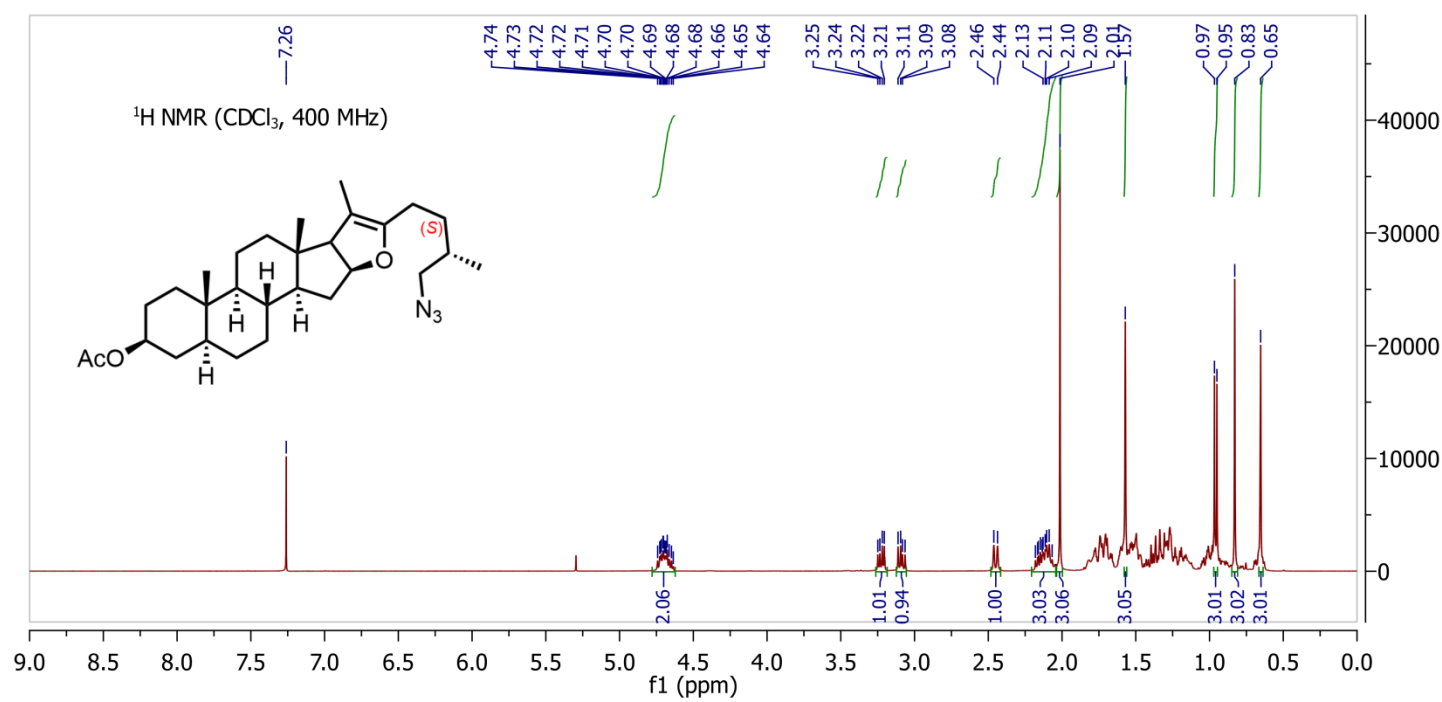


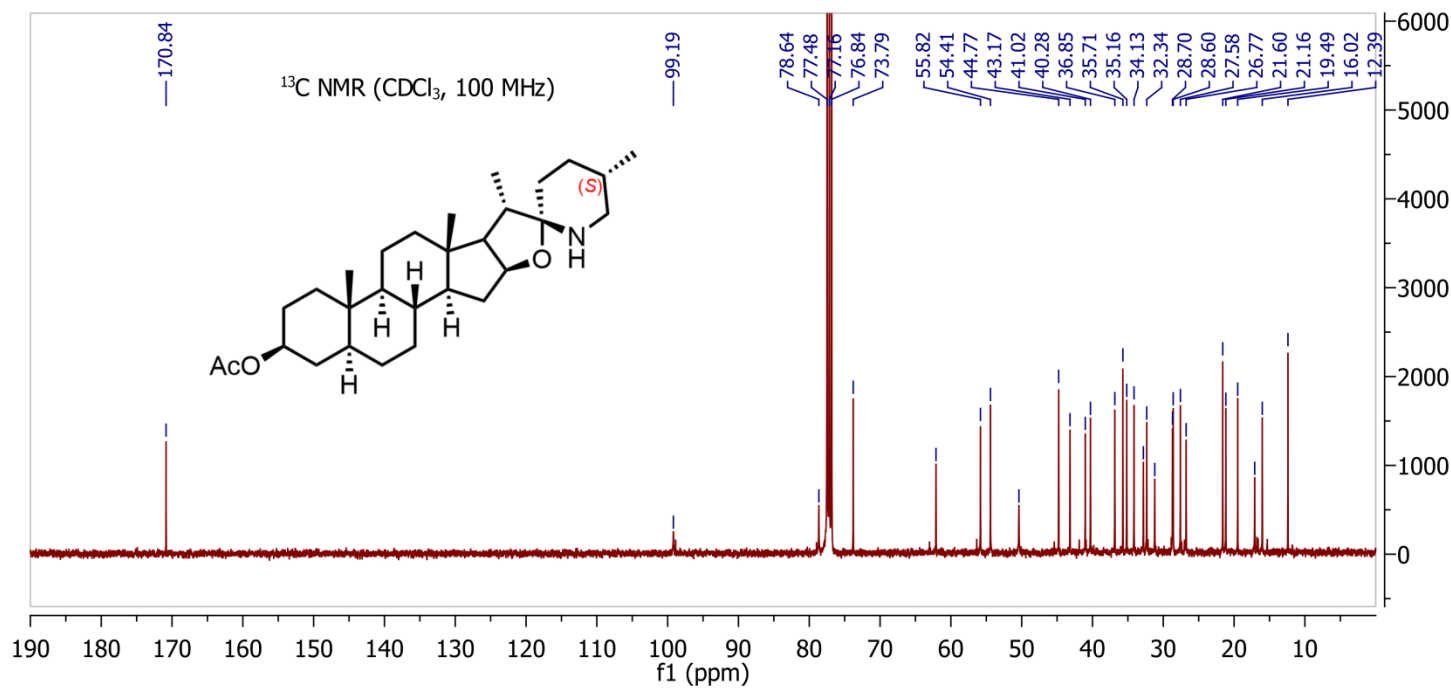
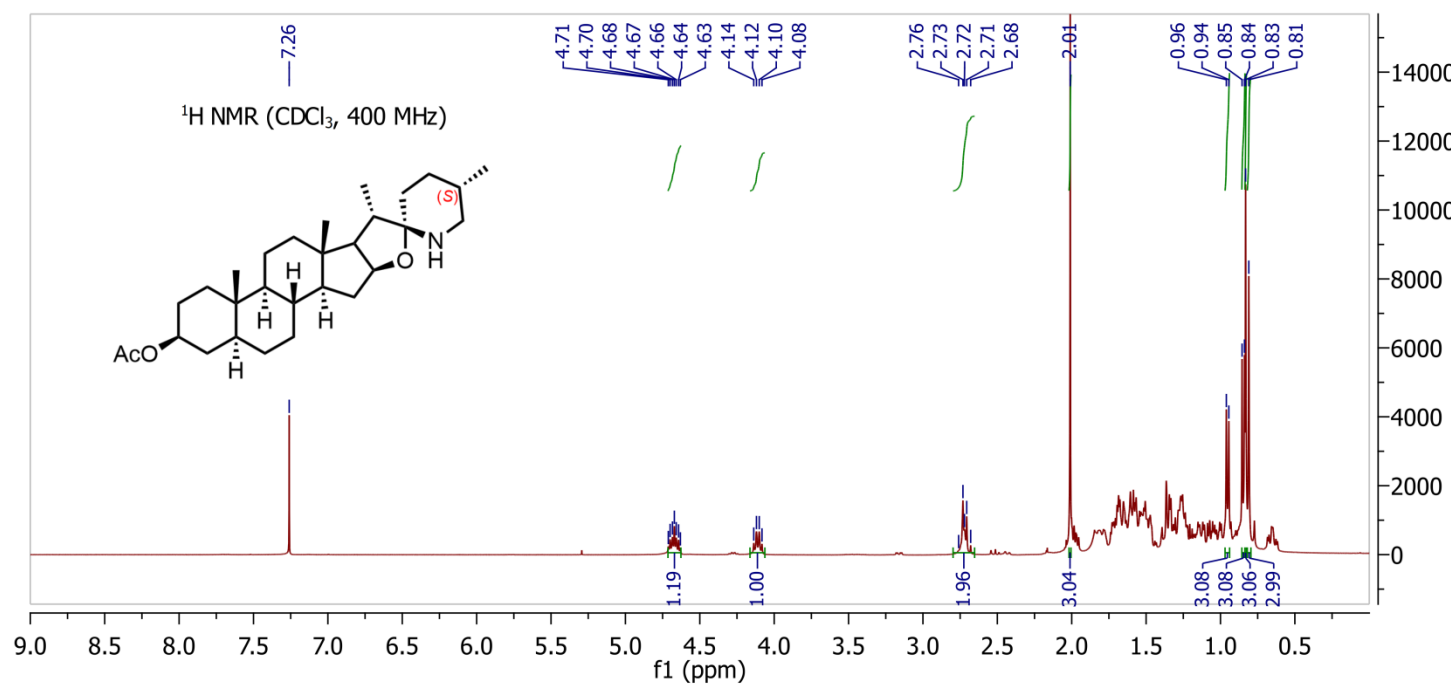


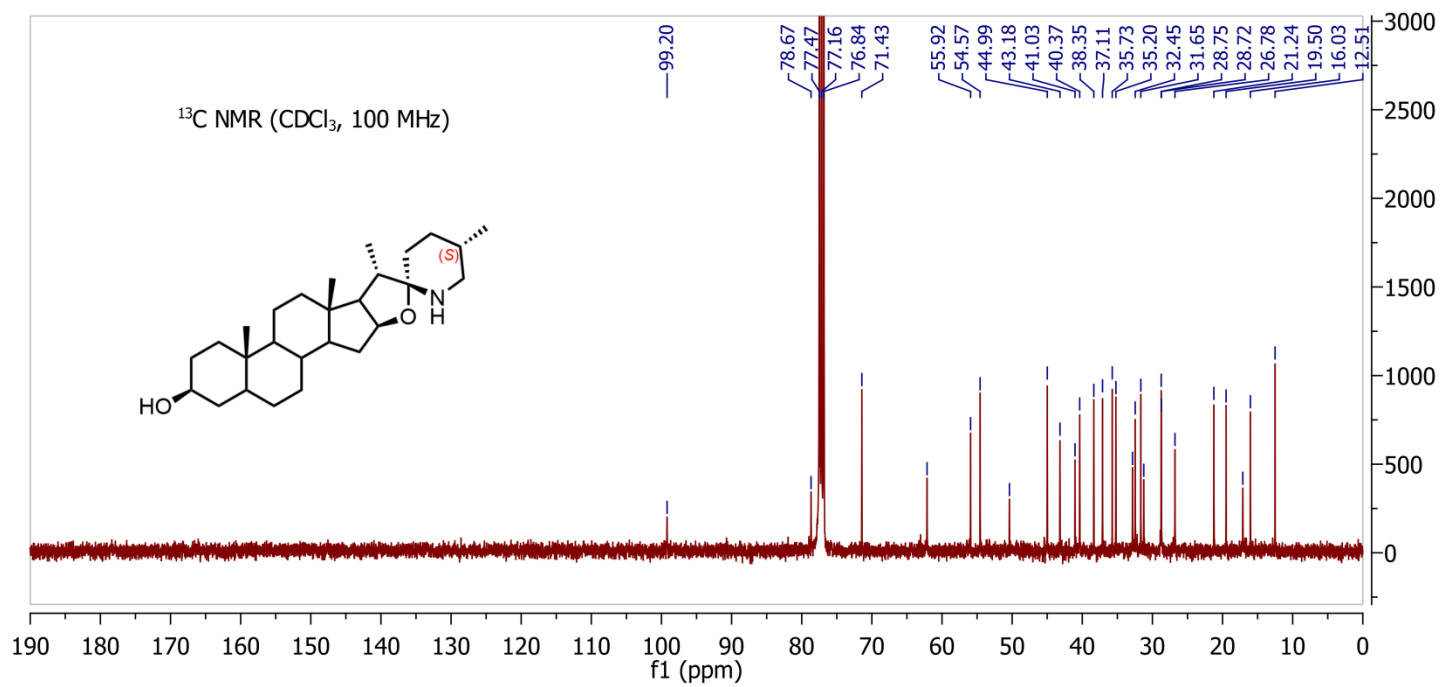
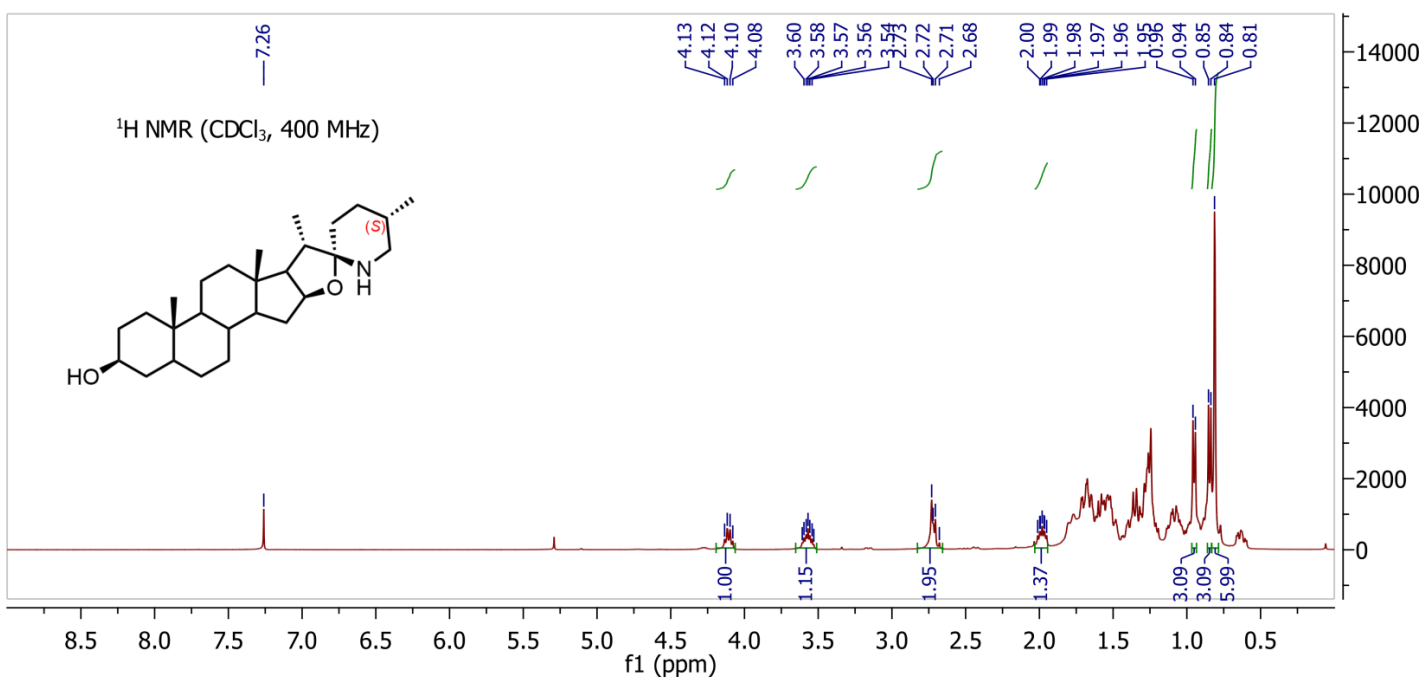












ANNEXE 4 : PARAMETRES ET COORDONNÉES DES STRUCTURES ANALYSÉES PAR
DIFFRACTION DES RAYONS-X DES TRAVAUX PRÉSENTÉS

Tableau 8. Crystal data and structure refinement for **48-1**

Empirical formula	C ₂₇ H ₄₄ O ₃ •H ₂ O
Formula weight	434.64 g/mol
Temperature (K)	173(2) K
Wavelength (Å)	1.54178 Å
Crystal system	Monoclinic
a (Å)	10.2169(3)
b (Å)	7.3367(2)
c (Å)	16.5675(4)
α (deg)	90
β (deg)	95.300(2)
γ (deg)	90
Volume (Å ³)	1236.56(6)
Z, Calculated density (g/cm ³)	1.167
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.594
F(000)	480
Crystal size (mm)	0.010 x 0.115 x 0.588 mm
Theta Range for data collection (deg)	2.68 to 70.94°
Index ranges	-12<=h<=11, -6<=k<=8, -19<=l<=20
Reflections collected/ unique	15325
Completeness	96.6%
Absorption correction	Multi-scan
Max. and min. transmission	0.9940 and 0.7210
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ parameter	3883 / 1 / 293
Goodness-of-fit on F2	1.025
Final R (I > 2σ (I))	R1 = 0.0557, wR2 = 0.1172
R indices (all data)	R1 = 0.0940, wR2 = 0.1340
Absolute structure parameter	0.2(3)
Largest diff. peak and hole (e. Å-3)	0.170 and -0.199

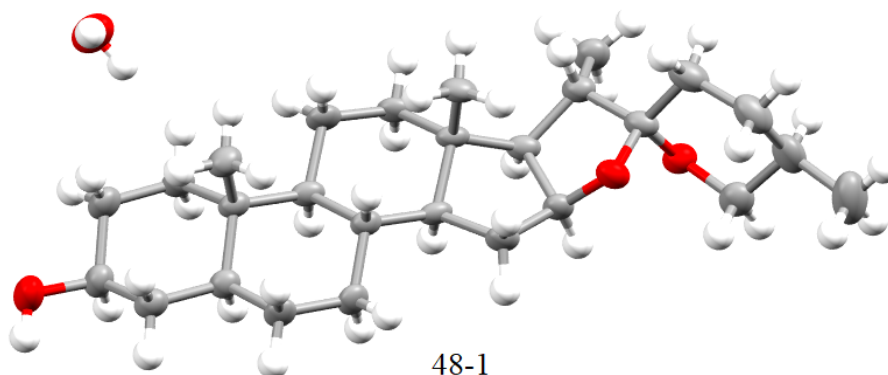
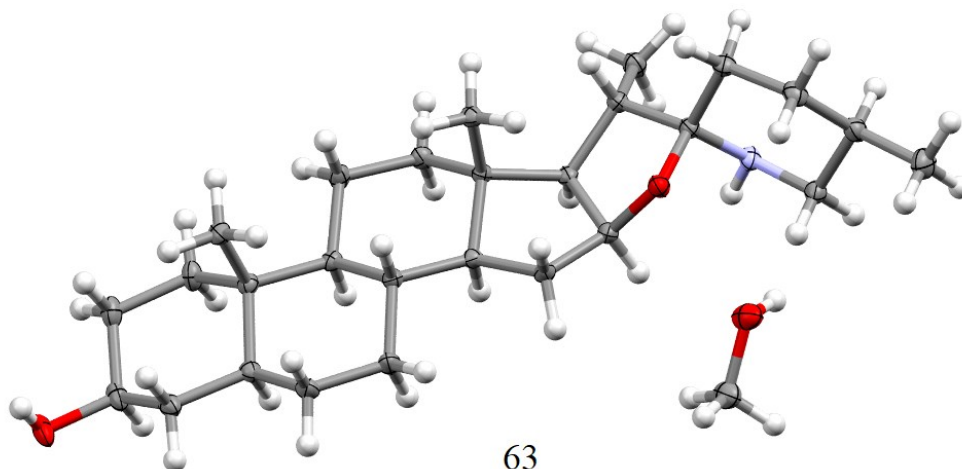


Tableau 9. Crystal data and structure refinement for **63**

Empirical formula	C ₂₇ H ₄₅ NO ₂ • CH ₃ OH
Formula weight	447.68 g/mol
Temperature (K)	173(2) K
Wavelength (Å)	1.54178 Å
Crystal system	Orthorhombic
a (Å)	7.4339(2)
b (Å)	11.1322(2)
c (Å)	30.8348(7)
α (deg)	90
β (deg)	90
γ (deg)	90
Volume (Å ³)	2551.75(10)
Z, Calculated density (g/cm ³)	1.165
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.570
F(000)	992
Crystal size (mm)	0.400 x 0.430 x 0.540 mm
Theta Range for data collection (deg)	2.87 to 71.14°
Index ranges	-8<= <i>h</i> <=9, -10<= <i>k</i> <=13, -37<= <i>l</i> <=36
Reflections collected/ unique	32260
Completeness	98.6%
Absorption correction	Multi-scan
Max. and min. transmission	0.8040 and 0.7840
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ parameter	4826 / 0 / 300
Goodness-of-fit on F2	1.009
Final R (I > 2σ (I))	R1 = 0.0341, wR2 = 0.0891
R indices (all data)	R1 = 0.0356, wR2 = 0.0904
Absolute structure parameter	0.0(1)
Largest diff. peak and hole (e. Å ⁻³)	0.115 and -0.154



ANNEXE 5 : PARAMETRES ET COORDONNÉES DES STRUCTURES ANALYSÉES PAR
DIFFRACTION DES RAYONS-X DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE PRÉSENTÉ

Table S4 Crystal data and structure refinement for **16**

Empirical formula	C ₂₈ H ₄₉ NO ₃
Formula weight	447.68 g/mol
Temperature (K)	173(2) K
Wavelength (Å)	1.54178 Å
Crystal system	Monoclinic
a (Å)	13.1901(3)
b (Å)	7.4298(2)
c (Å)	4.8397(4)
α (deg)	90
β (deg)	115.7420(10)
γ (deg)	90
Volume (Å ³)	1309.96(6)
Z, Calculated density (g/cm ³)	1.135
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.555
F(000)	496
Crystal size (mm)	0.144 x 0.370 x 0.450 mm
Theta Range for data collection (deg)	3.31 to 70.66°
Index ranges	-13<=h<=16, -8<=k<=9, -16<=l<=18
Reflections collected/ unique	17401
Completeness	98.30%
Absorption correction	Numerical Mu Calculated
Max. and min. transmission	0.7240 and 0.4690
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ parameter	4860 / 1 / 306
Goodness-of-fit on F2	1.047
Final R (I > 2σ (I))	R1 = 0.0564, wR2 = 0.1549
R indices (all data)	R1 = 0.0647, wR2 = 0.1614
Absolute structure parameter	-0.16(14)
Largest diff. peak and hole (e. Å ⁻³)	0.423 and -0.268

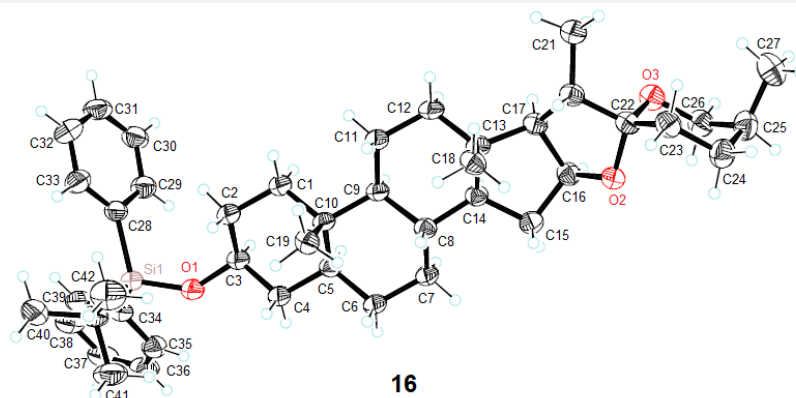


Table S5 Crystal data and structure refinement for **1**

Empirical formula	C ₂₈ H ₄₉ NO ₃
Formula weight	447.68 g/mol
Temperature (K)	173(2) K
Wavelength (Å)	1.54178 Å
Crystal system	Monoclinic
a (Å)	13.1901(3)
b (Å)	7.4298(2)
c (Å)	4.8397(4)
α (deg)	90
β (deg)	115.7420(10)
γ (deg)	90
Volume (Å ³)	1309.96(6)
Z, Calculated density (g/cm ³)	1.135
Absorption coefficient (mm ⁻¹)	0.555
F(000)	496
Crystal size (mm)	0.144 x 0.370 x 0.450 mm
Theta Range for data collection (deg)	3.31 to 70.66°
Index ranges	-13<= <i>h</i> <=16, -8<= <i>k</i> <=9, -16<= <i>l</i> <=18
Reflections collected/ unique	17401
Completeness	98.30%
Absorption correction	Numerical Mu Calculated
Max. and min. transmission	0.7240 and 0.4690
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/ restraints/ parameter	4860 / 1 / 306
Goodness-of-fit on F2	1.047
Final R (I > 2 σ (I))	R1 = 0.0564, wR2 = 0.1549
R indices (all data)	R1 = 0.0647, wR2 = 0.1614
Absolute structure parameter	-0.16(14)
Largest diff. peak and hole (e. Å ⁻³)	0.423 and -0.268

